

UNIVERZITA KARLOVA

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biochemie**

Studijní program: Biochemie



Daniel Jungwirth

**Biosyntéza terpenických sekundárních metabolitů u termitů**

Biosynthesis of terpenoid secondary metabolites in termites

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

Konzultant: Mgr. Jitka Štáfková, Ph.D.

Praha 2024



# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 23. 5. 2024

.....

# Abstrakt

Terpenoidy jsou nejbohatší skupinou přírodních látek, které se vyskytují v podobě desítek tisíc rozmanitých molekul napříč různými formami života, od mikroorganismů přes rostliny až po živočichy. Terpenoidy nalézáme také u hmyzu, druhově nejpočetnější živočišné skupiny, kde zastávají úlohu zejména v komunikaci a chemické obraně.

Ve srovnání s bohatými znalostmi o biosyntéze terpenoidů u rostlin jsou naše vědomosti o biosyntetickém původu terpenoidů u hmyzu velmi kusé a pocházejí vesměs z výzkumu posledních několika let. Tyto nové poznatky ukazují, že schopnost biosyntézy terpenoidů se vyvinula opakovaně a nezávisle u jednotlivých vývojových linií hmyzu a že hmyzí terpensyntasy vznikají prostřednictvím neofunkcionalizace genů, které byly původně zodpovědné za produkci isoprenylpyrofosfátů, a jejich následnou funkční diverzifikací. Mezi ostatními skupinami hmyzu vyčnívají termiti, kteří využívají širokou škálu isoprenoidů pro komunikaci a unikátní chemickou obranu. Nicméně vznik terpenoidních látek u termitů je stále neznámý.

Tato práce se zabývá funkční charakterizací tří domnělých terpensynthas termita druhu *Nasutitermes takasagoensis*. Expres vybraných proteinů probíhala ve dvou bakteriálních systémech a pro jejich purifikaci byla použita metoda afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech. Detekce vzniklých produktů reakce proteinů s prekurzory probíhala na dvoudimenzionálním plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. Terpensyntázovou aktivitu se podařilo zjistit pouze u jednoho z 3 exprimovaných proteinů, nicméně na základě zjištěných poznatků bude probíhat výzkum dalších domnělých terpensynthas u několika druhů termitů.

Klíčová slova: termiti, biosyntéza terpenů, isoprenoidy, funkční charakterizace, *Nasutitermes takasagoensis*

# Abstract

Terpenoids are natural compounds, which can be found in the form of tens of thousands diverse molecules in all forms of life. Terpenoids are mostly represented in plants, microorganisms, and animals. It should not be a surprise that terpenoids are often found in insects, the most species-rich class of Metazoa. In insects terpenoids are mostly used for communication as pheromones and for chemical defence. In comparison to widespread knowledge of terpene (and terpenoid) biosynthesis in plants we lack thorough knowledge in insects.

Studies conducted in past few years showed that the ability to synthesize terpenoids has occurred independently and repeatedly in various lineages of insects. It was also found that terpene synthase genes evolved via duplication and neofunctionalization of specific genes, which were responsible for isoprenyldiphosphate synthesis. Despite these discoveries the terpenoid synthesis in insects is mostly unknown and remains to be elucidated.

This thesis aims to functionally characterize three candidate terpene synthases from the termite *Nasutitermes takasagoensis*. Expression of selected proteins was done in two bacterial systems. For the purification of recombinant proteins immobilized metal ion affinity chromatography was used. Detection of products from assays with purified protein samples was done on two-dimensional gas chromatograph coupled with mass detector. Terpene synthase activity was detected only in one of three purified protein samples. Nonetheless the practical knowledge accumulated within this thesis will help in future research of more candidate TPS coding genes in several termite species.

Key words: termites, terpene biosynthesis, isoprenoids, functional characterization, *Nasutitermes takasagoensis*

[IN CZECH]

## Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé práce, Mgr. Jitce Štáfkové, PhD., a školitelce doc. RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za vedení a pomoc při sepisování této práce. Zároveň bych chtěl vyjádřit poděkování Mgr. Robertovi Hanusovi, PhD. za možnost vypracovat tuto práci v rámci výzkumu jeho vědecké skupiny. Nemenší dík patří i kolegům Natanovi Horáčkovi, Michalovi Tupcovi, Pavlíně Kyjakové a Stanislavu Macháčkovi za nekončící trpělivost při vysvětlování různých metod.

# Obsah

Obsah.....	1
1 Literární přehled.....	4
1.1 Úvod.....	4
1.2 Terpeny a terpenoidy .....	4
1.3 Biosyntéza terpenů a terpenoidů.....	7
1.3.1 Dráhy MEP a MVA.....	7
1.3.2 Prenyltransferasy .....	7
1.3.3 Terpensynthasy.....	8
1.4 Termiti .....	10
1.4.1 Role terpenoidů v chemické obraně a komunikaci termitů.....	11
1.4.2 <i>Nasutitermes takasagoensis</i> .....	12
2 Cíle práce.....	15
3 Materiál.....	16
3.1 Použité chemikálie .....	16
3.2 Použité přístroje a pomůcky .....	17
3.3 Roztoky, pufrý a média.....	18
3.4 Kmeny <i>Escherichia coli</i> :.....	21
4 Metody .....	21
4.1 Expresse rekombinantních proteinů v <i>E. coli</i> .....	21
4.2 Lyze.....	22
4.3 Vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) .....	22
4.4 Imunochemická detekce proteinu po přenosu na membránu (Western blot) .	23
4.5 Afinitní chromatografie.....	23
4.6 Odsolení vzorku NtGGPPS6 pomocí gelové permeační chromatografie.....	24
4.7 Štěpení proteinu NtGGPPS6 TEV proteasou .....	24
4.8 Reverzní afinitní chromatografie vzorku NtGGPPS6.....	24
4.9 Měření aktivity na GC-MS.....	24
4.9.1 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí .....	25

4.9.2	Dvoudimenzionální plynová chromatografie s TOF detekcí .....	25
5	Výsledky .....	26
5.1	NtGGPPS2-B.....	26
5.1.1	Exprese proteinu NtGGPPS2-B.....	26
5.1.2	Purifikace proteinu NtGGPPS2-B.....	27
5.1.3	Měření aktivity.....	28
5.2	NtGGPPS4 .....	29
5.2.1	Exprese proteinu NtGGPPS4 .....	29
5.2.2	Purifikace proteinu NtGGPPS4 .....	29
5.2.3	Měření aktivity.....	31
5.3	NtGGPPS6 .....	33
5.3.1	Exprese proteinu NtGGPPS6 .....	33
5.3.2	Purifikace proteinu NtGGPPS6 .....	34
5.3.3	Měření aktivity.....	37
6	Diskuse.....	39
7	Závěr .....	41
8	Seznam použité literatury .....	42



# Seznam zkratek a symbolů

anti-HisHRP	myší monoklonální protilátka proti polyhistidinovému epitopu konjugovaná s křenovou peroxidázou
APS	peroxodisíran amonný
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamminoctová
FARM	první motiv bohatý na aspartát (z anglického first aspartate rich motif)
FPP	farnesylypyrofosfát (z anglického farnesyl pyrophosphate)
GC×GC	dvoudimenzionální plynová chromatografie
GGPP	geranylgeranylpyrofosfát (z anglického geranylgeranyl pyrophosphate)
GPP	geranylpyrofosfát (z anglického geranyl pyrophosphate)
IDS	isoprenyldifosfátsynthasy (z anglického isoprenyl diphosphate synthase)
IMAC	afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech (z anglického immobilised metal affinity chromatography)
LB	lysogeny broth kultivační médium
MOPS	3-(N-morfolino)-propansulfonová kyselina
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
SDS	dodecylsíran sodný (z anglického sodium dodecyl sulfate)
SARM	druhý motiv bohatý na aspartát (z anglického second aspartate rich motif)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TPS	terpenové syntázy (z anglického terpene synthases)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
FPPS	farnesylypyrofosfát synthasa

# 1 Literární přehled

## 1.1 Úvod

Terpenoidy jsou velká a různorodá skupina přírodních látek, spojovaná především s rozmanitostí pachů a vůní. Většina znalostí o biosyntéze terpenoidů pochází ze studií zabývajících se rostlinnými terpensynthasami, zatímco u hmyzu je syntéza obestřena tajemstvím. Právě objasnění biosyntetického původu terpenoidů u termitů je jedna z oblastí, kterou se zabývá laboratoř Chemie společenského hmyzu na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Předkládaná bakalářská práce je součástí tohoto dlouhodobého projektu, přičemž se konkrétně věnuje termitímu druhu *Nasutitermes takasagoensis*. Cílem této práce je připravit a funkčně charakterizovat tři rekombinantní proteiny s možnou terpensynthasovou aktivitou, jejichž transkripty byly nalezeny u *N. takasagoensis*.

## 1.2 Terpeny a terpenoidy

Terpeny a jejich deriváty terpenoidy (obecně isoprenoidy) jsou jednou z největších tříd přírodních látek. Je známo více než 80 000 látek, které se řadí do této skupiny [1]. Část se řadí i do esenciálních olejů [2]. V organismech se univerzálně vyskytují jako primární metabolity, jež mají zásadní regulační, metabolickou a strukturální úlohu [3]. Příkladem je cholesterol, jenž je syntetizován sledem reakcí ze skvalenu. Cholesterol hraje roli v buněčných membránách, kdy jeho množství kromě jiného ovlivňuje fluiditu membrány. Cholesterol je také základem pro steroidní hormony. Další důležitou rolí isoprenoidů je prenylace proteinů [4] a menších molekul, například koenzymu Q10, který je jedním z přenašečů v dýchacím řetězci v mitochondriích [5]. Největší strukturní rozmanitost však lze připsat terpenoidům, které se vyskytují ve funkci sekundárních metabolitů, zodpovědných za komunikaci a chemickou obranu organismů.

Největší diverzitou terpenoidů jakožto sekundárních metabolitů oplývají rostliny a hmyz [6]. Velmi často slouží rostlinám jako atraktant pro opylovače a jako složka hmyzích feromonů, důležitou roli mají také v obraně hmyzu a rostlin proti predátorům, parazitům a mikrobiálním infekcím. V obranném kontextu se často vyskytují jako složité směsi monoterpenů, seskviterpenů a diterpenů. U rostlin mohou těkavé terpeny a terpenoidy sloužit k odpuzení herbivorního hmyzu tím, že fungují jako atraktant pro jejich přirozené nepřátele [7,8]. Kromě toho jsou terpeny důležitou složkou pryskyřice jehličnanů, která chrání strom před hmyzem, například leptáním dýchacích cest a znehybněním lepkavou složkou. Součástí pryskyřice jsou látky, které se chovají jako atraktanty pro parazitující hmyz, který následně napadá nakladená vajíčka nebo larvální stadia herbivorního hmyzu

[8]. Významnou diverzitu terpenových obranných a feromonových látek nalézáme také u společenského hmyzu, kde se mohou vyskytovat v celé řadě komunikačních funkcí v rámci složitého společenského života kolonie.

Terpenoidy jsou pro své vlastnosti po dlouhou dobu využívány lidmi. U mnoha terpenoidů byly potvrzeny různé farmakologické účinky. Terpenoidy jsou dlouhodobě zkoumány kvůli možnému využití v medicíně, zejména kvůli antioxidačním, protizánětlivým a antimikrobiálním vlastnostem, které byly potvrzeny např. u monoterpenů pinenu a linaloolu [9]. Deriváty terpenoidů jsou zkoumány pro léčbu rakoviny. Jedním z derivátů diterpenů je paclitaxel, který byl v minulém století zkoumán a je již několik let využíván pro léčbu onkologických onemocnění, zejména rakoviny prsu a plic [10]. Některé terpeny mají schopnost narušit buněčnou stěnu a inhibovat syntézu proteinů a DNA [2]. Kvůli vlastnosti inhibici syntézy DNA jsou terpenoidy testovány jako možné antivirotikum a *in vitro* bylo dosaženo pozitivních výsledků u několika typů virů (příkladem HIV, dengue, zika, herpes simplex a hepatitis virus) [11]. Jako antimalarikum se již několik desetiletí používá terpenoid artemisinin [12]. Uměle připravené deriváty artemisininu jsou testovány proti parazitům jako je *Toxoplasma gondii* [13].

V posledních letech probíhá intenzivní hledání alternativních biosyntetických paliv pro spalovací motory. Pozornosti neunikly ani terpeny a pro své vlastnosti byly testovány mimo jiné terpeny farnesen a bisabolen. Pro produkci byly využívány geneticky upravené kmeny bakterií *Escherichia coli*, *Rhodobacter capsulatus* a kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* [14,15].

Společným rysem isoprenoidů je základní skelet, který je tvořen ze základní jednotky isopren, což je uhlovodík o délce pěti atomů uhlíků obsahující 2 dvojně vazby se sumárním vzorcem  $C_5H_8$  [16]. Základní dělení isoprenoidů je založeno na počtu isoprenových jednotek, ze kterých se skládá skelet molekuly.

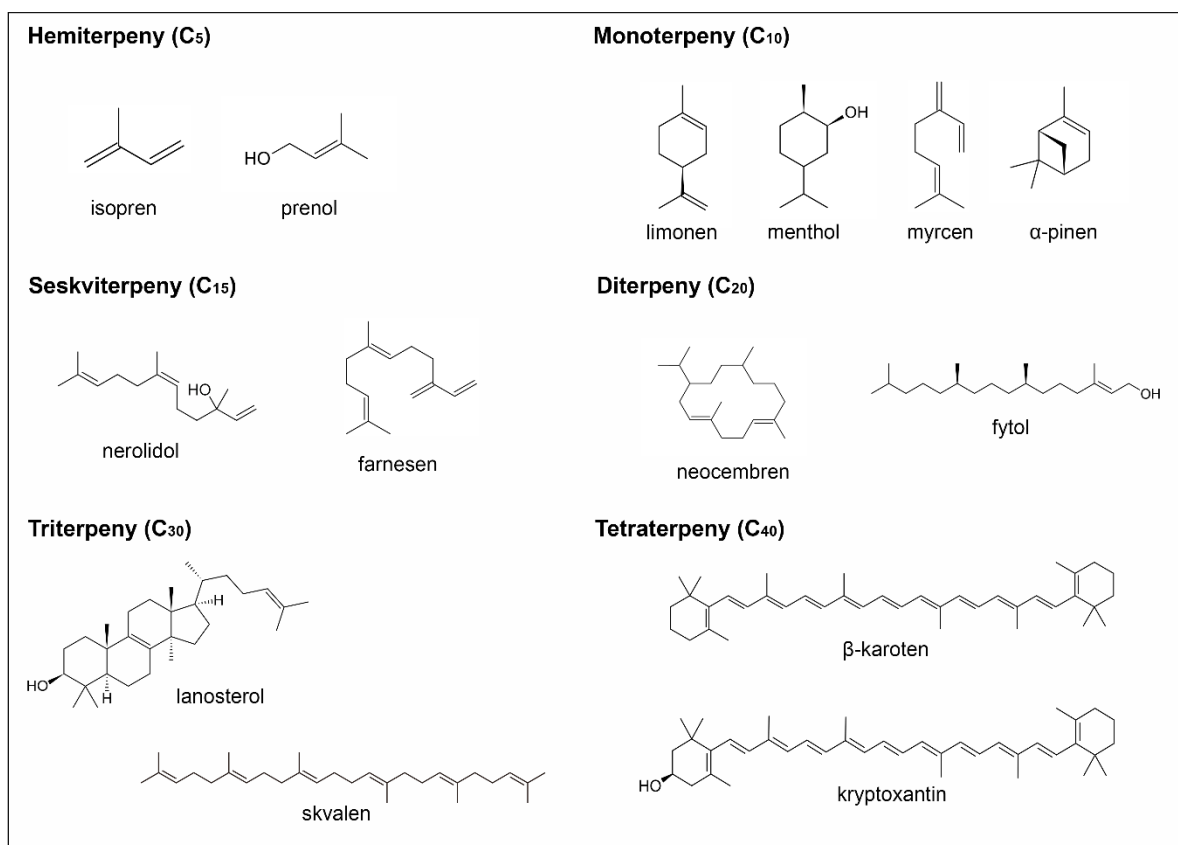
Hemiterpeny jsou látky s řetězcem obsahujícím pouze jednu jednotku. Monoterpeny obsahují jednotky dvě, seskviterpeny tři, diterpeny čtyři a stejným mechanismem je určeno názvosloví delších látek až po polyterpeny (viz Obrázek 1, strana 6). Podle typu řetězce se dají terpenoidy rozdělit na necyklické, monocyklické, bicyklické a polycyklické.

Terpeny v pravém smyslu slova jsou pouze uhlovodíkové řetězce, zatímco terpenoidy označují deriváty terpenů obohacené o funkční skupinu, nejčastěji obsahující atom kyslíku. Podle typu funkční skupiny se dají řadit do příslušných skupin jako alkoholy, ketony, estery, epoxidy a další [17–19].

Monoterpeny se dají obecně charakterizovat jako těkavé látky, které se dají lehce zachytit čichem. Prekurzorem pro syntézu je geranylpyrofosfát (GPP). Monoterpeny se

vyskytují jak v lineární, nebo cyklické formě. Typickým příkladem cyklické formy jsou pineny, které se vyskytují v pryskyřici a přispívají k ochraně proti škůdcům. Svoji roli hrají i v chemické obraně hmyzu. Dalším zástupcem monoterpenu je menthol, který je známý svojí silnou vůní. Dalšími četnými monoterpeny jsou limonen, kafr a geraniol. Díky svým vlastnostem jsou široce využívány v potravinářství a jiných odvětvích a produktech jako jsou parfémy.

Seskviterpeny biosynteticky vycházejí z prekursoru farnesylpyrofosfátu. Strukturně se seskviterpeny vyskytují jak v lineární, tak cyklické nebo bicyklické podobě. Mezi lineární seskviterpeny patří farnesol a farnesen, které jsou u rostlin jednou ze složek vůně. Mezi cyklické seskviterpeny patří například humulen a karyofylen.



**Obrázek 1:** Přehled dělení terpenů a terpenoidů dle délky řetězce; označení (C) u jednotlivých kategorií značí počet uhlíků ve vzorci.

Diterpeny jsou mimo jiné základem pro gibbereliny, což je skupina rostlinných hormonů, která zodpovídá za mnohé vývojové procesy, například klíčení a kvetení [20]. Prekurzor pro syntézu diterpenů je geranylgeranylpyrofosfát.

Mezi triterpeny patří skvalen, který je zásadní pro syntézu cholesterolu a z něj odvozených steroidních hormonů jako jsou pohlavní hormony a hormony kůry nadledvin. Mezi triterpeny patří též saponiny, které se vyskytují u rostlin.

Další významou skupinou jsou tetraterpeny, mezi které se řadí karotenoidy. Ty slouží u mnohých organismů jako barvivo, např. žlutočervený  $\beta$ -karoten. Označuje se též jako provitamin A a je pro živočichy důležitý pro syntézu vitamínu A [21].

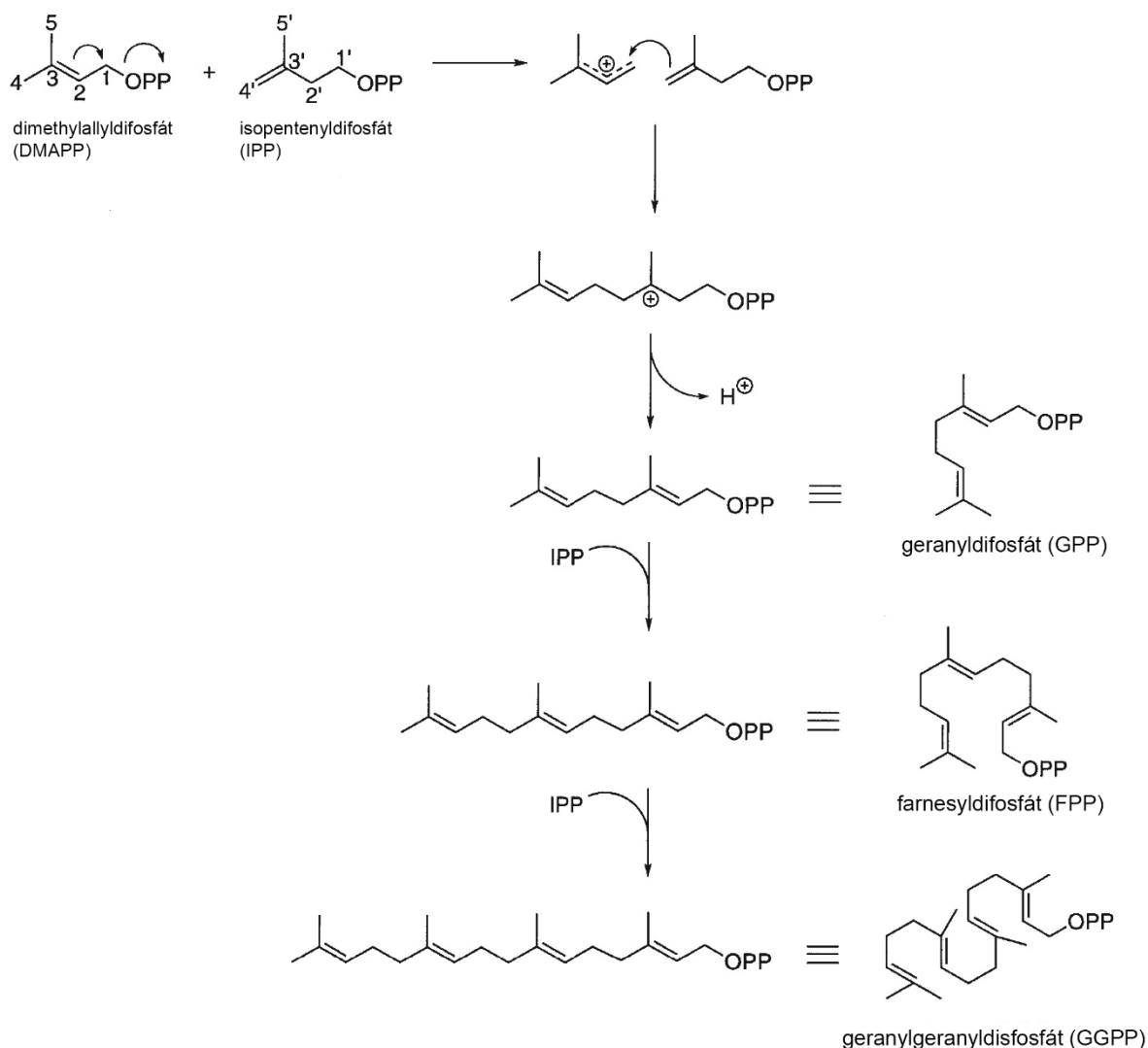
## 1.3 Biosyntéza terpenů a terpenoidů

### 1.3.1 Dráhy MEP a MVA

Základními kameny pro syntézu terpenů a terpenoidů jsou pětiuhlíkaté prekurzory isopentenylpyrofosfát (IPP) a jeho isomer dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) [12,22,23]. Všechny organismy jsou schopny jejich syntézy, nicméně přesný způsob se liší napříč organismy. Známé jsou dvě dráhy – mevalonátová (MEV) a methyleritritolová (MEP), která je někdy označována jako nemevalonátová a v novějších publikacích jako DXP (1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát). Výskyt obou drah v jednom organismu se nevyklučuje, například rostliny syntetizují terpenové prekurzy oběma způsoby [23]. Jednotlivé typy probíhají v rozdílných kompartmentech, MEP cesta probíhá v plastidech, zatímco MVA cesta probíhá v cytosolu. Kromě rostlin probíhá syntéza MEP cestou u bakterií. U živočichů a Archea probíhá syntéza zejména skrze dráhu MVA. Mevalonátová cesta má více variant, Archea využívají oproti eukaryotním organismům jiné enzymy a meziprodukty v několika krocích [24,25].

### 1.3.2 Prenyltransferasy

Prenyltransferasy, nebo také isoprenyldifosfátsynthasy (IDS) katalyzují kondenzaci produktů MVA a MEP dráhy za vzniku delších prekurzorů pro syntézu terpenů (viz Obrázek 2, strana 8). Trans-IDS enzymy obsahují v aktivním místě dvě oblasti bohaté na aspartát s motivem DDXXD označované jako FARM a SARM [4,26]. Tyto oblasti umožňují navázání dvoumocných kovových iontů, které se účastní katalýzy. Spojení dimethylallylpyrofosfátu a isopentenylpyrofosfátu probíhá v orientaci hlava-ocas. Délka vzniklého skeletu s pyrofosfátovou skupinou se liší podle specifity enzymu, která je ovlivněna vedlejšími řetězci u aktivního místa, a může čítat od 10 atomů uhlíku až po několik milionů [27–29]. Příkladem jsou geranylpyrofosfátsynthasy (označující se jako GPPS), které katalyzují reakci IPP a DMAPP za vzniku geranylpyrofosfátu (GPP), prekurzoru pro syntézu monoterpenů. Farnesylpyrofosfátsynthasy (FPPS) katalyzují syntézu farnesylpyrofosfátu z jedné molekuly dimethylallylpyrofosfátu a dvou molekul isopentenylpyrofosfátu [26]. Na stejném principu fungují i geranylgeranylpyrofosfátsynthasy (GGPPS), které katalyzují vznik geranylgeranylpyrofosfátu.



**Obrázek 2:** Syntéza prekurzorů GPP, FPP a GGPP. Přejato z [30].

### 1.3.3 Terpensynthasy

Z prekurzorů, jejichž tvorbu katalyzují prenyltransferasy, pak vznikají samotné terpeny nebo terpenoidy oxidačními, redukčními nebo cyklizačními reakcemi, které katalyzují terpensynthasy. Další složité úpravy probíhají za účasti cytochromů P450, glykosyltransferas nebo halogenas [31,32].

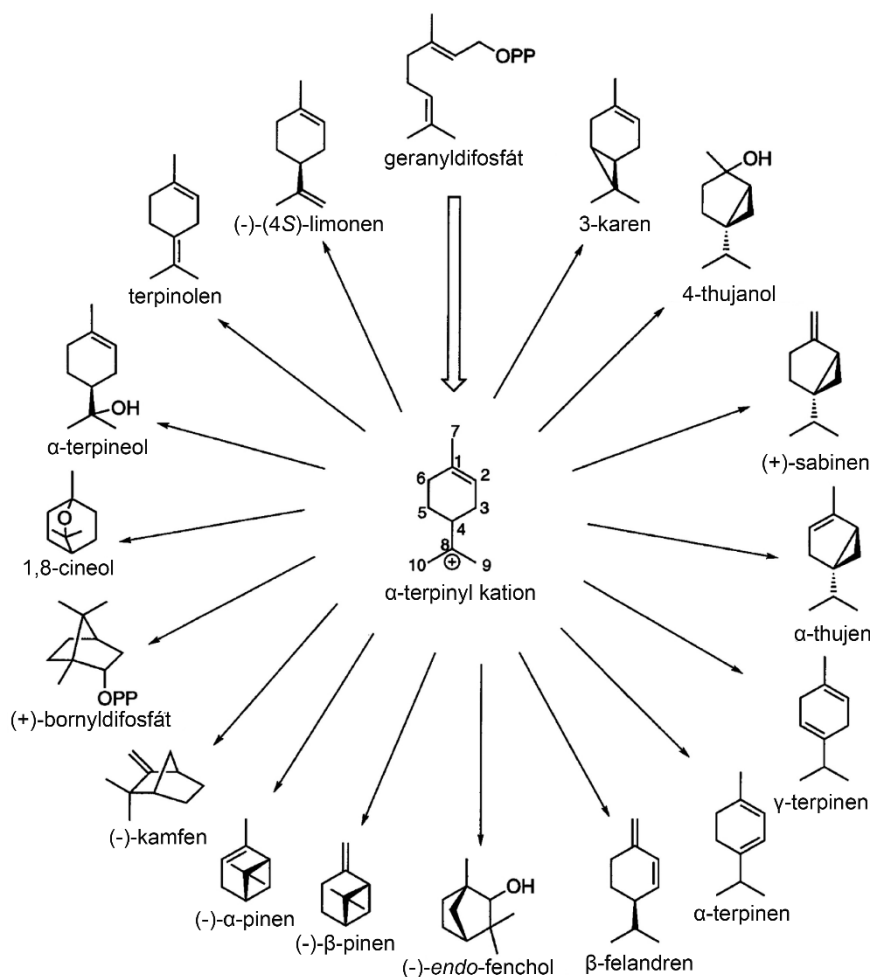
#### 1.3.3.1 Terpensynthasy u rostlin

Vzhledem k zastoupení a využití terpenoidů jsou nejvíce studovány terpensynthasy rostlin. V literatuře se často také označují jako terpenové cyklázy, nicméně jde o nepřesné označení, neboť TPS katalyzují i reakci lineárních produktů. TPS se dělí na dvě třídy na základě struktury a mechanismu katalýzy [33]. Enzymy třídy I obsahují oblasti bohaté na aspartát s motivem DDXXD [34]. Podobně jako u IDS hraje motiv DDXXD podstatnou roli, jelikož umožňuje koordinační vazbu dvoumocných hořečnatých nebo manganatých iontů na postranní řetězce motivu. Dvoumocné ionty interagují se substráty a zprostředkovávají

odštěpení pyrofosfátové skupiny za vzniku allylického kationtu. Do třídy I patří TPS, které syntetizují terpenický skelet o délce C<sub>5</sub> – C<sub>20</sub>.

Enzymy třídy II katalyzují syntézu delších terpenů počínaje diterpeny. Strukturně se od třídy I liší množstvím podjednotek, běžné jsou i 3 podjednotky ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Pro zahájení reakce využívají postranní řetězce kyseliny aspartové v motivu DXDD, čímž dochází na substrátu k tvorbě terciálního karbokationtu [1].

Monoterpensynthasy pro reakci potřebují geranylpyrofosfát (GPP) a cyklizační reakce probíhají přes meziprodukt vzniklý vazbou mezi C1 a C6 za vzniku  $\alpha$ -terpinyl karbokationtu. Následujícími reakcemi přes tento meziprodukt vzniká rozmanitá škála monocyklických nebo bicyklických monoterpenů (viz Obrázek 3) [1,30]. Mechanismus reakce je analogický u seskviterpensynthas a diterpensynthas, tedy s příslušným reakčním meziproduktem v podobě karbokationtu.



**Obrázek 3:** Monoterpenové produkty vycházející z  $\alpha$ -terpinylkationtu. Obrázek přejet z [30].

### 1.3.3.2 Terpensynthasy u hmyzu

Syntéza terpenů u hmyzu není v porovnání se syntézou u rostlin příliš objasněna. Syntéza *de novo* byla ověřena u několika druhů hmyzu [26,35]. U hmyzu a obecně u živočichů nebyly nalezeny homology rostlinných terpensynthas. V posledních letech bylo u některých druhů hmyzu nalezeno několik enzymů s TPS aktivitou, z řádu brouků *Ips pini* [36] a *Phyllotreta striolata* [37], z řádu polokřídlých *Murgantia histrionica* [38], *Nezara viridula* [39], *Halyomorpha halys* [40] a *Empoasca (Matsumurasca) onukii* [41], z řádu motýlů *Heliconius melpomene* [42] a z řádu dvoukřídlých *Lutzomyia longipalpis* [43]. Žádný z identifikovaných enzymů s TPS aktivitou u hmyzu není evolučně příbuzný rostlinným TPS enzymům, ale zato jsou příbuzné s IDS enzymy u příslušných druhů. Během evoluce tedy došlo u některých vývojových linií hmyzu k duplikacím genů IDS, v některých případech extenzivním. U duplikovaných genů nastala neofunkcionalizace a tím byla umožněna syntéza terpenoidních látek, včetně stejných látek, k jejichž syntéze dochází u rostlin. Tyto poznatky poukazují na konvergentní evoluci terpensynthas u rostlin a živočichů.

Pro syntézu terpenů u hmyzu jsou potřeba stejné prekurzory jako u rostlinných. U hmyzích TPS se nachází FARM a SARM motivy, které jsou zachované z ancestrálních IDS enzymů a mechanismus reakce probíhá pravděpodobně analogicky jako u TPS enzymů třídy I [40].

## 1.4 Termiti

Termiti jsou společenským hmyzem, který se řadí mezi šváby. Jejich přirozeným prostředím jsou tropické a subtropické savany, pralesy a pouště, přičemž kolem 70 % všech druhů žije v tropických oblastech [44]. Díky schopnosti živit se dřevem a rozkládající se organickou hmotou obsahující celulózu mají pro ekosystémy zásadní význam jako rozkladači [45].

Hlavním znakem je život ve společenstvu, které se dělí na několik kast [46]. Rozsah velikostí kolonií je od několika stovek jedinců až po několik miliónů. Hlavními kastami jsou dělníci, vojáci a král s královnou. Dělníci a vojáci jsou sterilní, veškeré rozmnožování zajišťuje královna s králem [47]. Kasty jsou na sobě závislé a nedokážou existovat samy o sobě. Uspořádání kast se může u jednotlivých druhů měnit, v zastoupení můžou chybět vojáci nebo dělníci [46,48]. Některé druhy můžou mít i více typů vojáků a dělníků [47]. Hlavní oporou kolonie jsou dělníci, již jsou zodpovědní za stavbu a udržování celého hnízda. Kromě toho také shání potravu, starají se o vajíčka, královnu s králem, vojáky a nedospělá stadia. Ochranu hnízda zajišťují vojáci, jejichž hlavními znaky jsou zvětšená sklerotizovaná hlava a zvětšená kusadla, která umožňují několik typů útoku. U evolučně



mladších skupin vojáci disponují exokrinními žlázami, které umožňují bránit se i chemickou cestou, často na úkor funkce kusadel.

Všechny druhy termitů se živí lignocelulózou, která tvoří základní složku buněčných stěn dřevitých rostlin [49]. Schopnost rozkládat dřevo nebo půdní hmotu závisí zejména na střevních mikrobech, které jsou s termity v mutualistickém vztahu. Mezi takové mikroby spadají bakterie, Archea, nebo bičíkatí prvoci. Zajímavostí jsou zástupci termitů spadající do podčeledi Macrotermitinae, již využívají jako zdroj živin houby rodu *Termitomyces*, které si pěstují v hnízdě [50].

Hnízda jsou různorodá a jejich tvar, velikost a složení se liší podle místních podmínek. Hnízda termitů slouží především k obraně před predátory, kromě obratlovců jsou hlavním nepřítelem termitů mravenci. Královna s králem jsou chráněni v dedikované královské komnatě uprostřed hnízda. Hnízda mohou být vybavena obrannými místy, které lze zablokovat. U některých druhů jsou vojáci vybaveni zvětšenou hlavou a specifickým tvarem, díky kterému utěsní vchod a zabrání tak průniku nepřítele do hnízda. U některých druhů jde o složité stavby, které umožňují regulovat vnitřní klima. To je podstatné například u rodu *Macrotermes*, jehož dělníci staví v oblasti subsaharské Afriky vysoká hnízda v podobě komínu, který slouží k výměně plynů, a samotné chodbičky s místnostmi jsou v podzemí.

#### 1.4.1 Role terpenoidů v chemické obraně a komunikaci termitů

Komunikace v termitím společenství probíhá více způsoby. Zásadní roli hraje chemická komunikace. Při nalezení potravy dochází k vylučování stopovacího a agregačního feromonu. U *Rhinotermitidae* a *Termitidae* je hlavní složkou (*Z,Z,E*)-3,6,8-dodekatrien-1-ol [51], který zároveň u mnoha druhů zastává funkci pohlavního feromonu [52]. Pohlavní feromony hrají roli pro hledání partnera, okřídlené budoucí královny jím přilákávají budoucí krále k páření [53]. Královské feromony slouží k udržení organizace společenství. U druhu *Embiratermes neotenicus* zastává tuto roli seskviterpenoid (*3R,6E*)-nerolidol, jehož přítomnost blokuje vývoj nových královen ze samičích nymf [54]. Poplašné feromony termitů jsou popsány níže.

Termiti využívají chemickou a fyzickou obranu, některé druhy používají oba typy. Hlavní roli v chemické obraně hrají labiální, labrální a především frontální žláza. Frontální žláza je nepárový orgán, který se vyvinul u moderní termití skupiny Neoisoptera, tj. především čeledi *Serritermitidae*, *Rhinotermitidae* a *Termitidae*. Žláza se nachází v hlavě a je u většiny druhů výrazněji znatelná pouze u vojáků, u kterých má jako hlavní využití syntézu látek pro obranu [55]. Vyústění je většinou modifikovaná fontanela v podobě póru. Vyústění může mít i jiné podoby, například u rodu *Nasutitermes* se fontanela přeměnila

do tvaru protáhlého útvaru připomínající roh, jenž má ústí žlázy na konci a nazývá se nasus.

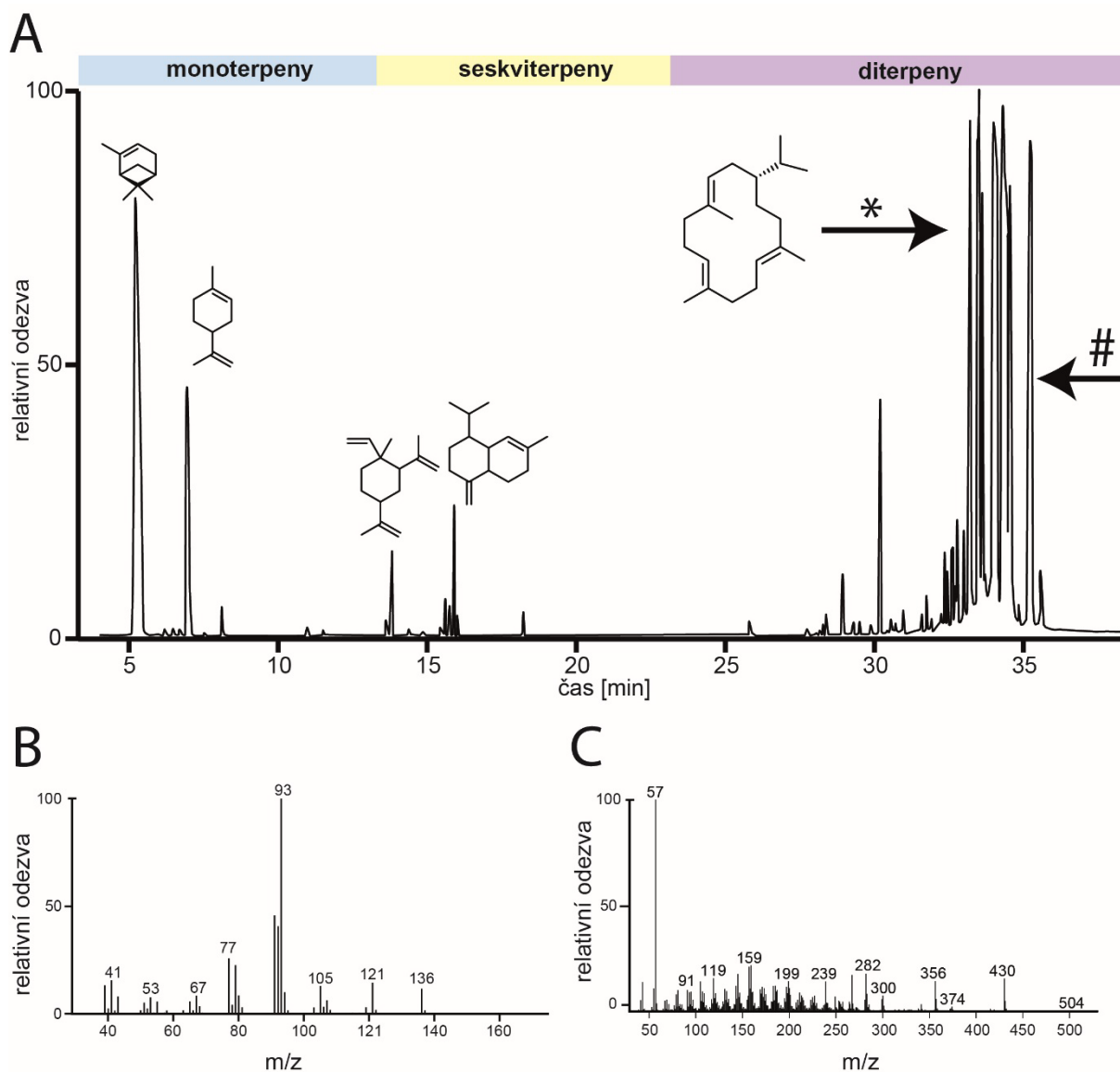
Právě evoluce frontální žlázy u Neoisoptera je spojena se vznikem biosyntézy terpenoidů jakožto obranných sekundárních metabolitů termitů. Ve frontální žláze je u různých druhů syntetizována škála různých látek lišící se způsobem syntézy, fyzikálními vlastnostmi a molekulární strukturou. Mezi hlavní produkované látky však patří právě terpenoidy [56–58], někdy doplněné i o jiné třídy látek, jako např. toxické nitroalkeny [59,60]. Obranné terpenické sekrety obvykle sestávají z velkého množství těkavých monoterpenů, seskviterpenů a cyklických diterpenů. Na vzduchu směs oxiduje a zasaženému nepříteli způsobí problémy s pohybem. Směs má i dráždivé účinky, které donutí nepřítel se škrabat a čistit, čímž je efektivně vyřazen z boje [56].

Kromě využití při kontaktní obraně postupně terpenické sekundární metabolity převzaly také komunikační úlohu. Často slouží jako poplašné feromony, např. (*E,E*)- $\alpha$ -farnesen u druhu *Prorhinotermes canalifrons* nebo  $\alpha$ -pinen u druhu *Nasutitermes princeps* [60]. V neposlední řadě se terpenoidy uplatňují i ve funkci královského feromonu, jako výše zmíněný seskviterpen (*3R,6E*)-nerolidol. Dosud bylo u termitů identifikováno více než 100 různých mono-, seskvi- a diterpenů, z nichž některé jsou unikátní a nebyly nalezeny u žádného jiného organismu [58]. Biosyntéza terpenických látek termitů nebyla dosud objasněna, pouze byl prokázán jejich vznik mevalonátovou cestou [35].

#### 1.4.2 *Nasutitermes takasagoensis*

Vojáci rodu *Nasutitermes* jsou vybaveni čistě chemickou obranou. Vypouštěná směs obsahuje velké množství terpenických látek. V hexanových extraktech vojáků byly nalezeny monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny (viz Obrázek 4, strana 13).

Na základě experimentů s prekurzory mevalonátové dráhy značenými <sup>14</sup>C bylo prokázáno, že diterpenické látky jsou schopni sami syntetizovat *de novo* a nejsou tedy závislí na vnějším zdroji [35]. Zároveň byla navržena syntéza polycyklických diterpenů ze společného monocyklického prekurzoru neocembrenu [35,61], který vzniká cyklizací geranylgeranylpyrofosfátu.



**Obrázek 4:** Analýza hexanových extraktů vojáků *N. takasagoensis*. **A** – Chromatogram z hmotnostního spektrometru s vyznačením struktur hlavních terpenických produktů a neocembrenu ze kterého vznikají dle navržené biosyntetické dráhy polycyklické diterpenické látky (\*). **B** – Hmotnostní spektrum monoterpenu  $\alpha$ -pinenu. **C** – Hmotnostní spektrum polycyklického diterpenu (značeno v panelu A znakem #). Extrakce z těl probíhala v hexanu po dobu 10 minut. Na 1 tělo bylo použito 20  $\mu$ l hexanu.

V minulých letech bylo objasnění biosyntézy obranných látek u druhu *N. takasagoensis* tématem několika prací japonských vědců. Z hlav vojáků byly vyloučeny vzorky frontálních žláz a izolovaná RNA byla připravena cDNA knihovna. V ní bylo identifikováno 7 genů homologních s GGPPS (NtGGPPS1-7) [62]. Kromě toho byly také nalezeny geny podílející se na mevalonátové cestě, která je klíčová k syntéze prekurzorů IPP a DMAPP [63]. Vzhledem ke zjištěné zvýšené expresi těchto genů v hlavách vojáků v porovnání s ostatními kastami autoři předpokládají jejich zapojení do biosyntézy terpenů nebo jejich prekurzorů [48,62]. Počet genů kódujících domnělé enzymy účastnící se mevalonátové dráhy a syntézy prekurzoru diterpenů byl porovnán napříč 3 dalšími druhy termitů (*Z. nevadensis*, *M. natalensis* and *C. secundus*) a 1 druhem švába (*B.*

*germanica*) [48]. Porovnáním byla zjištěna extenzivní duplikace GGPPS genů *N. takasagoensis* oproti zbylým druhům [48,62]. Všechny identifikované sekvence mají zachované sekvenční motivy FARM a SARM, u kterých se domníváme, že jsou podstatné pro TPS aktivitu. O samotnou funkční charakterizaci těchto enzymů se dosud nikdo nepokusil. Zjištění funkce vybraných sekvencí (NtGGPPS-2B, NtGGPPS-4 a NtGGPPS-6) je téma této práce.

## 2 Cíle práce

Svou bakalářskou práci jsem vypracovával jako součást širšího projektu týmu Dr. Hanuse zaměřeného na odhalení biosyntetického původu některých termitích terpenických sekundárních metabolitů. Konkrétní cíle práce byly následující:

- Exprese tří rekombinantních proteinů v bakteriálním systému *E. coli* a jejich purifikace (NtGGPPS2-B, NtGGPPS4, NtGGPPS6)
- Stanovení TPS aktivity purifikovaných proteinů
- Získání dostatečného množství rekombinantního proteinu NtGGPPS6 pro krystalizační experimenty

## 3 Materiál

### 3.1 Použité chemikálie

Bioline, Německo	IPTG
ForMedium, Velká Británie	D(+)-laktósa monohydrát kvasničný extrakt pepton
Lach-ner s.r.o., Neratovice	chlorid sodný glycerol 99,9% kyselina octová 99% methanol tris(hydroxymethyl)aminomethan Tween-20
Penta, Chrudim	dihydrogenfosforečnan draselný D-glukosa glycin síran amonný
ROTH, Německo	lysozym PMSF SDS sušené mléko TEMED
SERVA, Německo	40% akrylamid
Sigma-Aldrich, Německo	Antifoam A concentrate APS Coomassie Brilliant Blue R-250 deoxyribonukleasa I z hovězí slinivky GPP GGPP chloramfenikol imidazol 2-merkaptoethanol myší monoklonální protilátka proti polyhistidinovému epitopu konjugovaná s křenovou peroxidázou kanamycin
Thermo Scientific, USA	PageRuler™ plus Prestained Protein Ladder

	Pierce™ ECL Western Blotting Substrate kit
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha (připravil Mgr. Michal Doležal, PhD.)	TEV proteasa

### 3.2 Použité přístroje a pomůcky

analytické váhy	At261 DeltaRange, Mettler Toledo, USA
autokláv	SANoclav, Adolf Wolf, Německo
blokový termostat	sbh130d, Stuart, Velká Británie
centrifugy	Avanti JXN-30, Beckman Coulter, USA MiniSpin, Eppendorf, Německo U-320R, Boeco, Německo
centrifugační filtr	Amicon Ultra-15 10 kDa MWCO, Sigma-Aldrich, USA
chromatografický systém	ÄKTA start, Cytiva, USA ÄKTA pure, Cytiva, USA
elektroforetická sada	SE250 Mighty small II mini vertical 0,75 mm, Hoefer Inc, USA
filtry ze skelných vláken	MN GF-6 retention 0,6 µm, Macherey-Nagel, Německo
kultivační láhve	Tunair 2,5 l baffled shake flask, IBI Scientific, USA
otáčivé válečky	SRT6D roller mixer, Stuart, Velká Británie
plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem	GC×GC-TOF-MS Pegasus 4D, Leco, USA TRACE 1310 ISQ, Thermo Scientific, USA
homogenizátor	Avestin Emulsiflex C3, Austrálie skleněný homogenizátor s teflonovým pístem, Kartell, Itálie
kolony	HisTrap HP 5 ml, Cytiva, USA HisTrap FF 5 ml, Cytiva, USA HiPrep 26/10 Desalting, Cytiva, USA
pipety	Nichipet, Nichiryō, Japonsko Proline, Biohit, Finsko Pipetman, Gilson, Francie
třepané inkubátory	Innova S44i shaker, Eppendorf, Německo NB-205, N-biotek, Jižní Korea

spektrofotometr	Biospectrometer, Eppendorf, Německo NanoDrop One, Thermo Scientific, USA
ultrazvukový homogenizátor	UP200St, Hielscher Ultrasonics, Německo
vlákno pro mikroextrakci na tuhou fázi	SPME Fiber Assembly 100 $\mu$ m PDMS, Fused Silica 23Ga (Red), Sigma-Aldrich, USA
zdroj pro elektroforézu	EV265, Consort, Belgie
zobrazovací systém	Azure c600, Azure Biosystems, USA

### 3.3 Roztoky, pufry a média

#### LB

- 10 g/l pepton
- 5 g/l kvasničný extrakt
- 10 g/l chlorid sodný
- pH 7

#### autoindukční médium

- 15 g/l kvasničný extrakt
- 10 g/l pepton
- 10 g/l glycerol
- 2 g/l D-laktosa
- 0,5 g/l D-glukosa
- 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 50 mM NaCl
- 25 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 3 mM  $\text{MgSO}_4$
- pH 7,5

#### 10× fosfátový pufr (PBS)

- 80 g/l NaCl
- 2 g/l KCl
- 26,8 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 2,4 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- pH 7,4

#### antibiotika

- kanamycin 30 mg/ml (zásobní roztok ve vodě)
- chloramfenikol 30 mg/ml (zásobní roztok v ethanolu)



### **5× vzorkový pufr (PLB) 25 ml**

- 0,38 g tris(hydroxymethyl)aminomethan
- 2,5 ml  $\beta$ -merkaptoethanol
- 1 g SDS
- 5 ml glycerol
- 3 mg bromfenolová modř
- pH 6,8

### **barvicí roztok (1 l)**

- 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250
- 450 ml methanol
- 100 ml octová kyselina
- objem doplněn destilovanou vodou na 1000 ml

### **odbarvovací roztok (1 l)**

- 450 ml methanol
- 100 ml octová kyselina
- objem doplněn destilovanou vodou na 1 l

### **10× Tris-glycinový pufr pro SDS-PAGE (1 l)**

- 10 g SDS
- 30,3 g Tris
- 144,1 g glycin
- objem doplněn destilovanou vodou do 1 l

### **rozdělovací gel**

- 4,8 ml destilovaná voda
- 2,5 ml 40% akrylamid
- 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 100  $\mu$ l 10% SDS
- 5  $\mu$ l TEMED
- 100  $\mu$ l 10% APS

### **zaostřovací gel**

- 3 ml destilovaná voda
- 0,4 ml 40% AA
- 0,5 ml 1,5 M Tris (pH 6,8)
- 40  $\mu$ l 10% SDS
- 4  $\mu$ l TEMED
- 40  $\mu$ l 10% APS

### **přenosový pufr (1,5 l)**

- 150 ml 10× Tris-glycinový pufr pro SDS-PAGE
- 300 ml methanol
- objem doplněn do 1,5 l destilovanou vodou

### **5% roztok sušeného mléka**

- 50 ml 1× PBS
- 2,5 g sušeného mléka
- 25 µl Tween-20

### **1% roztok sušeného mléka**

- 50 ml 1× PBS
- 25 µl Tween-20
- 0,5 g sušeného mléka

### **lyzační pufr**

- 100 g/l glycerol
- 300 mM NaCl
- 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2 mM MgSO<sub>4</sub>
- 10 mM imidazol
- 0,5 mg/ml lysozym
- 5 mg/l deoxyribonukleasa I
- 5 µM CaCl<sub>2</sub>
- pH 6,7

### **odmývací pufr**

- 100 g/l glycerol
- 300 mM NaCl
- 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2 mM MgSO<sub>4</sub>
- 10 mM imidazol
- 10 mM β-merkapt ethanol
- pH 6,7

### **eluční pufr**

- 100 g/l glycerol
- 300 mM NaCl
- 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2 mM MgSO<sub>4</sub>
- 500 mM imidazol
- 10 mM β-merkapt ethanol
- pH 6,7

## MOPS pufr

- 10 mM MOPS
- 5 mM MgCl<sub>2</sub> / MnCl<sub>2</sub>
- 1 mM DTT
- 10% (v/v) glycerol
- pH 7,0

## 3.4 Kmeny *Escherichia coli*:

Použity byly bakterie *E. coli* kmene Lemo21(DE3), které umožňují titraci míry exprese rekombinantního proteinu, a LOBSTR-BL21(DE3)-RIL které jsou uzpůsobeny pro expresi proteinů s méně častými kodóny. Oba tyto kmeny jsou rezistentní vůči chloramfenikolu.

Bakterie byly transformované plasmidy pRSFDuet, které nesly rezistenci vůči kanamycinu a kódující sekvence zkoumaných proteinů rodiny GGPPS pocházející z termita *N. takasagoensis*. Na 5' konec příslušné sekvence byla přidána sekvence kódující histidinovou kotvu. Exprimované rekombinantní proteiny tedy nesly histidinovou kotvu na N konci. Sekvence kódující fúzní protein NtGGPPS6 obsahuje navíc mezi histidinovou kotvou a vlastní kódující sekvencí NtGGPPS6 krátkou sekvenci kódující štěpící místo TEV proteasy.

Tabulka 1: Expresní systémy rekombinantních proteinů

název proteinu	použitý kmen <i>E. coli</i>	použitý plasmid
NtGGPPS2-B	LOBSTR-BL21(DE3)-RIL	pRSFDuet_NtGGPPS2B
NtGGPPS4	Lemo21(DE3)	pRSFDuet_NtGGPPS4
NtGGPPS6	LOBSTR-BL21(DE3)-RIL	pRSFDuet_NtGGPPS6

## 4 Metody

### 4.1 Exprese rekombinantních proteinů v *E. coli*

Startovací kultura *E. coli* byla připravena z glycerolových zásob uchovávaných v - 80 °C inokulací do LB média sterilizovaného horkou vodní parou po dobu 20 minut při 120 °C v autoklávu. Špičkou pipety bylo nabráno menší množství zmrzlých buněk do 7 ml média s kanamycinem a chloramfenikolem (30 mg/ml). Takto vytvořená startovací kultura byla ponechána růst přes noc do druhého dne v třepaném inkubátoru (NB-205 shaker) při 37 °C a 250 ot./min. Druhý den byla změřena optická denzita při 600 nm.

Pro další kultivaci bylo připraveno 2,5 l sterilního autoindukčního média. Médium bylo v laminárním boxu suplementováno kanamycinem (konečná koncentrace 30 mg/l) a chloramfenikolem (konečná koncentrace 30 mg/l). V případě kultivace kmenu *E. coli*

Lemo21(DE3) bylo dále přidáno 0,1 mmol/l L-ramnosy. Do média byla přidána startovací kultura pro dosažení  $OD_{600} = 0,01$ . Médium bylo rovnoměrně rozděleno do 6 sterilizovaných kultivačních lahví a pro snížení pěnivosti byly do každé láhve přidány 1-2 kapky činidla Antifoam A concentrate.

Kultura v autoindukčním médiu byla ponechána na třepacím aparátu (Innova S44i shaker) 4-6 hodin při 37 °C a 220 ot./min, následně byly podmínky upraveny na 17 °C a 180 ot./min a kultivace probíhala dalších 15-16 hodin.

## 4.2 Lyze

Biomasa byla separována od kultivačního média centrifugací (3000×g; 20 minut; 4 °C, Avanti JXN-30). Pelet byl zvážen a následně převeden do kádinky s lyzačním pufrem. Objem lyzačního pufru odpovídal desetinásobku hmotnosti peletu. Směs byla homogenizována ve skleněném homogenizátoru s teflonovým pístem. Lyzát byl míchán 1 hodinu v laboratorní teplotě na otáčivých válečcích a po přidání  $\beta$ -merkaptoethanolu (výsledná koncentrace 10 mM) další 1 hodinu v chladové místnosti v teplotě 6-8 °C. Následná homogenizace probíhala dvěma způsoby – sonikací, nebo pomocí přístroje Emulsiflex.

V případě sonikace byl lyzát postupně sonikován po dávkách 70 ml v kádince chlazené ledovou lázní. Sonikace podílu byla prováděna v 8 cyklech, které trvaly 40 sekund a mezi jednotlivými cykly byla pauza 10 sekund. Amplituda byla nastavena na maximum.

Alternativně byl lyzát homogenizován opakovaným průchodem skrze homogenizátor Emulsiflex. Vnitřní tlak přístroje byl nastaven na 2,4 bar.

Po dokončení homogenizace byl lyzát 3× centrifugován (30 000× g; 4 °C; 10 min) s tím, že se pracovalo jen se supernatantem. Za účelem analýzy pomocí SDS-PAGE byl po první centrifugaci pelet resuspendován destilovanou vodou do původního objemu.

## 4.3 Vertikální elektroforéza v denaturujícím polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Pro přípravu gelů byly použity nalévací aparatura. Do prostoru mezi elektroforetickými skly byl pomocí automatické pipety přenesen roztok pro separační gel. Roztok byl převrstven destilovanou vodou nebo isopropanolem a ponechán polymerovat po dobu 20 minut. Poté byla vrchní vrstva vysušena a na separační gel byl nanesen roztok pro zaostřovací gel. Navrch byl přidán hřeben pro jamky. Připravené gely byly umístěny do elektroforetické aparatury, která byla naplněna 200 ml 1× koncentrovaného Tris-glycinového pufru.

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny odebráním 20  $\mu$ l vzorku a přidáním 5  $\mu$ l 5 $\times$  koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru (rPLB). Vzorky byly povařeny ve vodní lázni po dobu 5 minut. Případný precipitát byl odstraněn centrifugací (5 min, 13400 ot./min, MiniSpin Eppendorf).

Do jamek bylo nanášeno 8-10  $\mu$ l vzorku. Aparatura byla zapojena do zdroje napětí po dobu 40-60 minut s nastaveným napětím 175 V. Gel byl následně barvený 1-2 hodiny v barvicím roztoku. Poté byl promýván v odbarvovacím roztoku. V případě použití gelu pro přenos a následnou imunochemickou detekci gel barven nebyl.

#### 4.4 Imunochemická detekce proteinu po přenosu na membránu (Western blot)

Polyakrylamidový gel se separovanými proteiny byl přiložen na PVDF nebo nitrocelulózovou membránu v přenosovém pufru. Ta byla dána do kazety pro Western blot (složení: měkčení, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, měkčení). Kazeta byla vložena do hlavní nádoby s chladícím balením a zalita transferovým pufrem, který byl předem vychlazen na 4 °C. Přenosová vana byla následně připojena ke zdroji a po dobu 1 h probíhal přenos proteinů na membránu pod napětím 100 V.

Po přenosu proteinů na membránu v elektrickém poli byla membrána blokována 5% roztokem sušeného mléka. Poté byla membrána inkubována s protilátkou anti-HisHRP (20000 $\times$  ředění v roztoku 1% sušeného mléka). Následně byla membrána promyta 3 $\times$  1% roztokem sušeného mléka po dobu 10 min. Jako substrát peroxidázy pro spuštění chemické reakce byl použit kit Pierce ECL Western Blotting Substrate. Pro detekci chemiluminiscenčního signálu byl použit přístroj Azure c600.

#### 4.5 Afinitní chromatografie

Pro metodu afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech byly používány chromatografické systémy ÄKTA Start a ÄKTA pure.

Po detekci rekombinantního proteinu v supernatantu byl lyzát před samotnou purifikací centrifugován (30 000 $\times$ g, 4 °C, 10 min) a následně zfiltrován v aparatuře s odsáváním přes výměnný kruhový filtr s 6  $\mu$ m póry. Kolona byla ekvilibrována promývacím pufrem. Následně byl na kolonu nanášen lyzát.

Pro purifikaci proteinů NtGGPPS2-B a NtGGPPS4 byl použit systém ÄKTA Start. Celá metoda byla provedena při laboratorní teplotě, nádoby s lyzátem a pufrů byly během metody chlazeny ledem. Po nanesení lyzátu byla kolona promývána 200 ml promývacího pufru. Uvolnění proteinu z kolony bylo provedeno zvyšováním podílu elučního pufru v mobilní fázi. Frakce byly jímány po 1 ml při průtoku 1 ml za minutu. Eluční frakce, které

podle hodnot absorbance (280 nm) obsahovaly uvolněné proteiny, byly zamraženy vložením do suchého ledu a skladovány při -80 °C.

Pro purifikaci proteinu Nt6 byl použit systém ÄKTA Pure. Metoda byla prováděna při stálé teplotě 6 °C v chladové místnosti. Po nanesení lyzátu byla kolona promývána 100 ml promývacího pufru. Uvolnění proteinu z kolony bylo provedeno zvyšujícím se gradientem elučního pufru. Frakce byly jímány po 2 ml při průtoku 1 ml za minutu. Eluční frakce, které podle hodnot absorbance (280 nm) obsahovaly uvolněné proteiny, byly zamraženy vložením do suchého ledu a skladovány při -80 °C.

#### 4.6 Odsolení vzorku NtGGPPS6 pomocí gelové permeační chromatografie

Frakce z afinitní chromatografie, u kterých byl pomocí metod SDS-PAGE a Western blot detekován protein NtGGPPS6, byly spojeny a pomocí centrifugačního filtru (Amicon Ultra-15 10 kDa MWCO) zakoncentrovány na objem 10 ml na stolní centrifuze (BOECO U-320R) s nastavením 6000× g, 4 °C.

Samotná chromatografie byla provedena na chromatografickém systému ÄKTA Pure. Jako kolona byla použita HiPrep 26/10 Desalting, která obsahuje porézní sepharosu, díky které je možné separovat proteiny od imidazolu a solí. Kolona byla ekvilibrována 2× kolonovým objemem promývacího pufru použitého při afinitní chromatografii. Frakce byly sbírány po 5 ml do zkumavek.

#### 4.7 Štěpení proteinu NtGGPPS6 TEV proteasou

Frakce z gelové filtrace, které obsahovaly proteiny detekované pomocí hodnot absorbance při 280 nm, byly sjednoceny. K vzorku bylo přidáno 1 ml roztoku TEV proteasy (koncentrace 1 mg/ml) a směs byla ponechána inkubovat 16 hodin v chladové místnosti při 8 °C.

#### 4.8 Reverzní afinitní chromatografie vzorku NtGGPPS6

Metoda byla použita pro separaci proteinu NtGGPPS6 s odštěpenou histidinovou kotvou od TEV proteasy. Metoda probíhala na chromatografickém systému ÄKTA Pure. Jako kolona byla použita kolona HisTrap 5 ml FF, která byla ekvilibrována promývacím pufrům z metody afinitní chromatografie (kapitola 4.7). Eluce probíhala zvyšujícím se gradientem elučního pufru ku promývacímu pufru. Během eluce byl průtok nastaven na 1 ml/min.

#### 4.9 Měření aktivity na GC-MS

Pro měření byl použit MOPS pufr s přísávkem manganatých nebo hořečnatých iontů (5 mM). Do skleněné vialky o objemu 2 ml byly pipetovány objemy dle následující tabulky.

Tabulka 2: Složení měřených reakcí. Pro měření se vzorky proteinu NtGGPPS2-B a NtGGPPS4 byl přidán GPP a pro měření se vzorkem NtGGPPS6 byl použit GGPP

protein	vzorek proteinu (μl)	MOPS pufr (μl)	prekurzor (50mg/ml)
NtGGPPS2-B	3	95	GPP
NtGGPPS4	3	95	GPP
NtGGPPS6	3	95	GGPP
Negativní kontrola	0	95	GPP / GGPP

Do vialky bylo skrze septum vsunuto SPME vlákno a reakční směs byla následně po dobu 1 hodiny inkubována ve vyhřevném bloku při teplotě 30 °C. Po ukončení inkubace bylo vlákno vsunuto do inletu plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem.

Pro detekci produktů bylo využito vícero metod plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

#### 4.9.1 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Byl využit chromatograf TRACE 1310 ve spojení s hmotnostním detektorem ISQ LT typu kvadrupól s elektronovou ionizací. Byla použita kolona TG-5MS (30 m × 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm). Vzorek byl dávkován manuálně, injektor byl nastaven na teplotu 250 °C. Hmotnostní rozsah detektoru byl nastaven na rozpětí m/z 29–650. Jako nosný plyn bylo použito helium s konstantním průtokem 1,5 ml/min. Teplotní program: 50 °C bylo drženo 1 minutu, teplotní rampa 8 °C/min do 320 °C, teplota byla držena 5 minut.

#### 4.9.2 Dvoudimenzionální plynová chromatografie s TOF detekcí

Metoda probíhala na dvoudimenzionální plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí GC×GC-TOF-MS; Pegasus 4D BT). Jako primární kolona byla použita Rxi-5MS (délka 30 m, vnitřní průměr 250 μm). Jako sekundární kolona byla použita Rxi-15MS (2 m, vnitřní průměr 100μm). Vzorek byl dávkován manuálně, teplota nástřiku byla nastavena na 250°C. Teplotní program: 50°C bylo drženo 1 minutu, teplotní rampa 8°C/min do 320°C, teplota byla držena 5 minut.

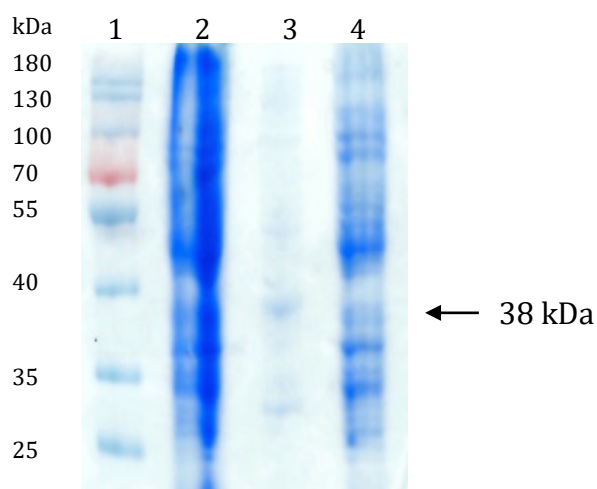
# 5 Výsledky

## 5.1 NtGGPPS2-B

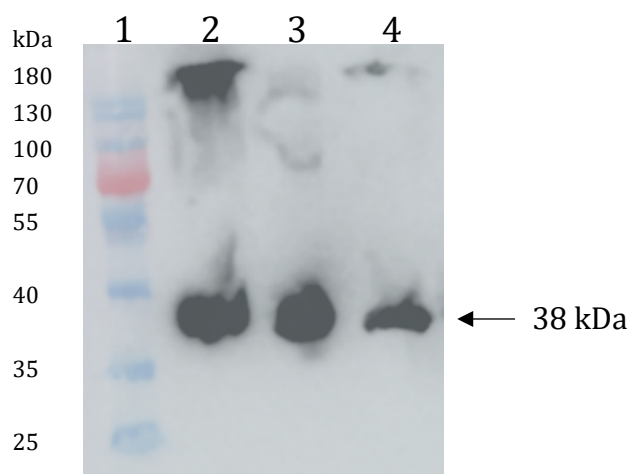
### 5.1.1 Exprese proteinu NtGGPPS2-B

Expresa proteinu probíhala v kmenu LOBSTR *E. coli*, čímž bylo získáno 35 g bakteriální biomasy. Buňky byly homogenizovány sonikací (kapitola 4.2). Pro detekci proteinů v rozpustné a nerozpustné frakci lyzátu byly použity metody SDS-PAGE a Western blot.

Na základě detekce proteinu NtGGPS2-B ve vzorku supernatantu (Obrázek 5 a 6, dráha 2) byl protein v lyzátu purifikován dle metody 4.5.



**Obrázek 5:** 10% polyakrylamidový gel obarvený Coomassie Blue s analyzovanými vzorky lyzátu s proteinem NtGGPPS2-B (molekulová hmotnost proteinu = 38 kDa). Objem dávkovaných vzorků 8  $\mu$ l. Popisky drah: 1 – proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2 – vzorek lyzátu; 3 - vzorek resuspendovaného peletu, 4 – vzorek supernatantu.

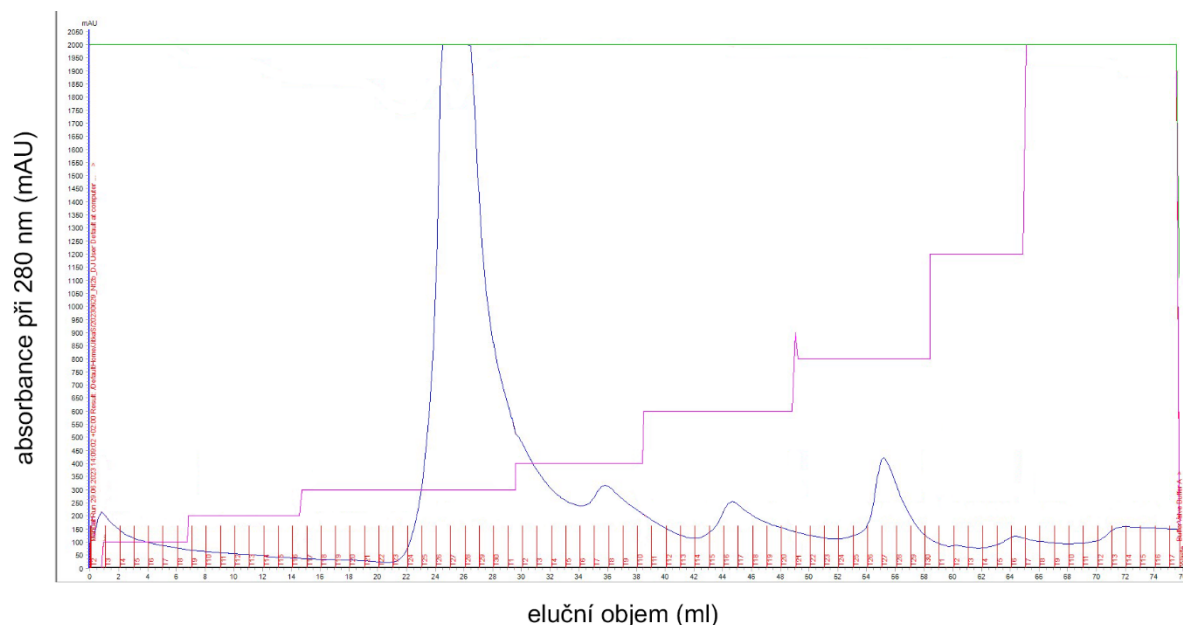


**Obrázek 6:** Imunodetekce proteinu NtGGPPS2-B v lyzátu. Popisky drah: 1 – proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2 – vzorek lyzátu; 3 - vzorek resuspendovaného peletu; 4 – vzorek supernatantu

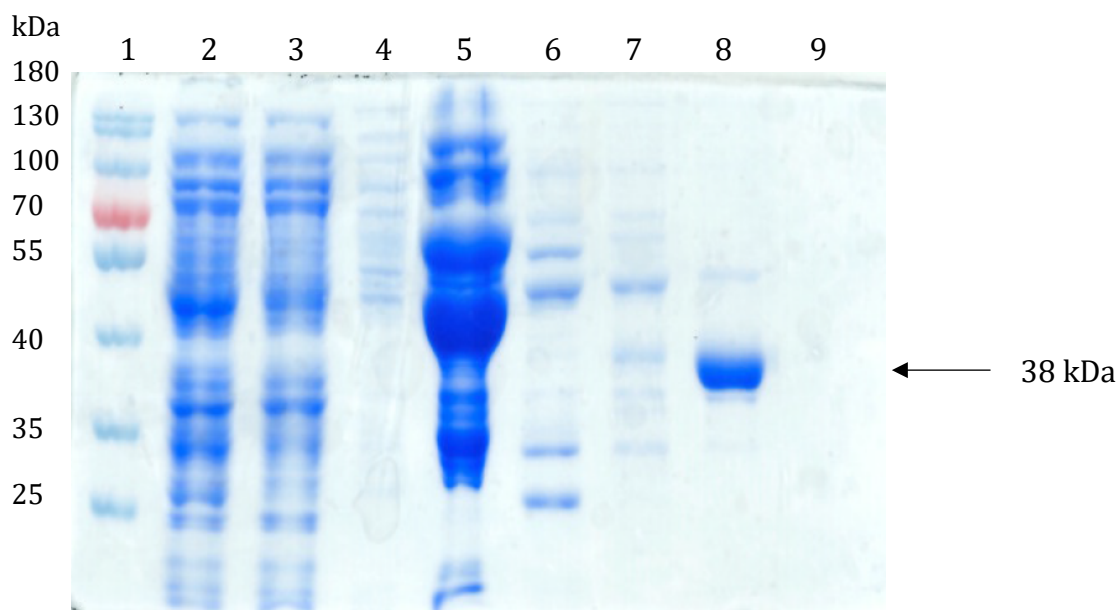


### 5.1.2 Purifikace proteinu NtGGPPS2-B

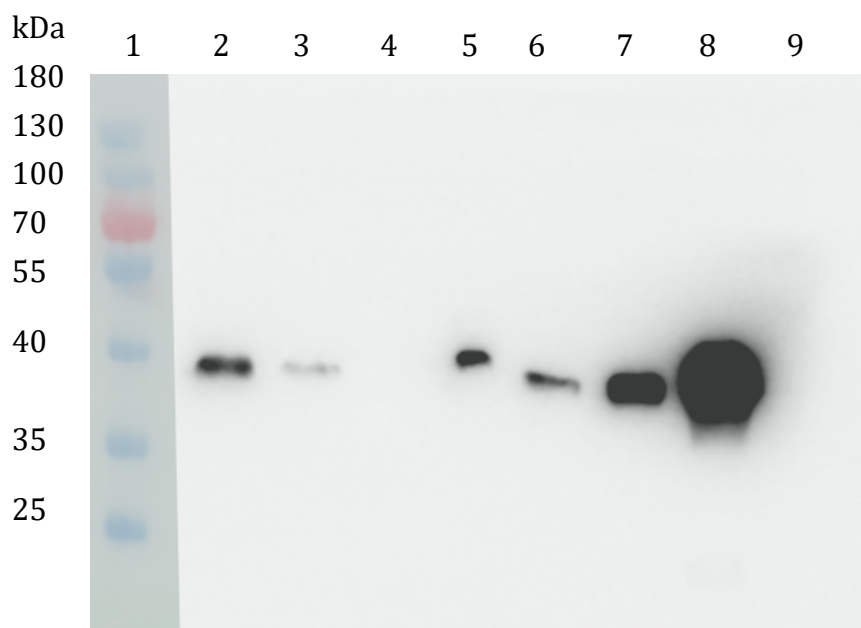
Afinitní chromatografie probíhala za laboratorní teploty na systému ÄKTA Start za použití purifikační kolony HisTrap HP 5 ml (Obrázek 7). Pro eluci proteinu byla zvyšována koncentrace elučního pufru v mobilní fázi (kapitola 4.5). Eluce proteinů proběhla v několika pících. Analýza frakcí s proteinu (Obrázek 8 a 9) proběhla pomocí metod SDS-PAGE a Western blot (kapitola 4.3 a 4.4).



**Obrázek 7:** Chromatogram průběhu purifikace proteinu NtGGPPS2-B metodou afinitní chromatografie (kapitola 4.5). Na ose x je vyneseny eluční objem (ml) a označení frakcí, na ose y je hodnota absorbance při 280 nm (mAU). Modrá křivka – naměřená hodnota absorbance v závislosti na čase, fialová křivka vyznačuje gradient elučního pufru (0-100 %). Systém a podmínky: ÄKTA start, kolona HisTrap HP 5 ml, mobilní fáze – odmývací a eluční pufr, průtok 1 ml za minutu.



**Obrázek 8:** Obarvený 10% polyakrylamidový gel se vzorky z afinitní chromatografie proteinu NtGGPPS2-B. Objem dávkovaného vzorku 10  $\mu$ l. Popisky drah: **1** – Proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **2** – vzorek dávkovaný na kolonu; **3** – vzorek proteinů nezachycených na koloně; **4** – proteiny uvolněné během omývání kolony; **5** – frakce 27; **6** – frakce 37; **7** – frakce 46; **8** – frakce 56; **9** – frakce 66.



**Obrázek 9:** Detekce proteinu NtGGPPS2-B nesoucího histidinovou kotvu metodou Western blot. Objem dávkovaného vzorku 10  $\mu$ l. Popisky drah: **1** – Proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **2** – vzorek dávkovaný na kolonu; **3** – vzorek nezachycených proteinů; **4** – proteiny uvolněné během omývání kolony; **5** – frakce 27; **6** – frakce 37; **7** – frakce 46; **8** – frakce 56; **9** – frakce 66

Dráha 2 obsahuje vzorek proteinů z lyzátu před afinitní chromatografií. V porovnání s dráhou 3, která obsahuje vzorek proteinů, které nebyly na koloně zachyceny, je vidět úbytek signálu na obarveném gelu kolem molekulové hmotnosti 38 kDa. Na snímku zachycujícím chemický signál je zřetelný silný signál v dráze 2, naopak v dráze 3 je signál velice slabý. Dráha 4 obsahuje vzorek proteinů uvolněných během omývání kolony. Přítomny jsou pouze bakteriální proteiny, pomocí metody Western blot nebyl detekován žádný signál. V dráze 5 je silný signál velkého množství proteinů na obarveném gelu. Pomocí chemické detekce byl zachycen slabší signál proteinu NtGGPPS2-B. V této dráze je na obarveném gelu vidět značné znečištění kontaminujícími bakteriálními proteiny. Dráha 6 neobsahuje na obarveném gelu signál odpovídající hmotnosti purifikovaného proteinu. Pomocí chemické detekce byl detekován slabý signál. Dráha 7 obsahuje na obarveném gelu slabý proužek odpovídající molekulové hmotnosti proteinu NtGGPPS2-B, jehož přítomnost potvrzuje i chemická detekce, ale dráha je zároveň znečištěna kontaminujícími proteiny. V 8. dráze, která odpovídá eluční frakci 56, je viditelný silný signál, který odpovídá molekulové hmotnosti proteinu NtGGPPS2-B (38 kDa), což je potvrzeno i chemickou detekcí. Frakce 56 (dráha 8) byla kvůli vysoké koncentraci a čistotě použita jako vzorek proteinu pro následující experimenty.

### 5.1.3 Měření aktivity

Vzorek proteinu byl inkubován s prekurzorem geranylpyrofosfátem dle metody popsané v kapitole 4.9. Měření vzniklých produktů proběhlo na plynovém chromatografu

s hmotnostním detektorem (GC×GC-TOF-MS Pegasus 4D) dle metody popsané v kapitole 4.9.2.

Při porovnání s měřením negativní kontroly nebyl detekován žádný signál vzniklých produktů, které by protein NtGGPPS2-B vyprodukoval z prekursoru GPP.

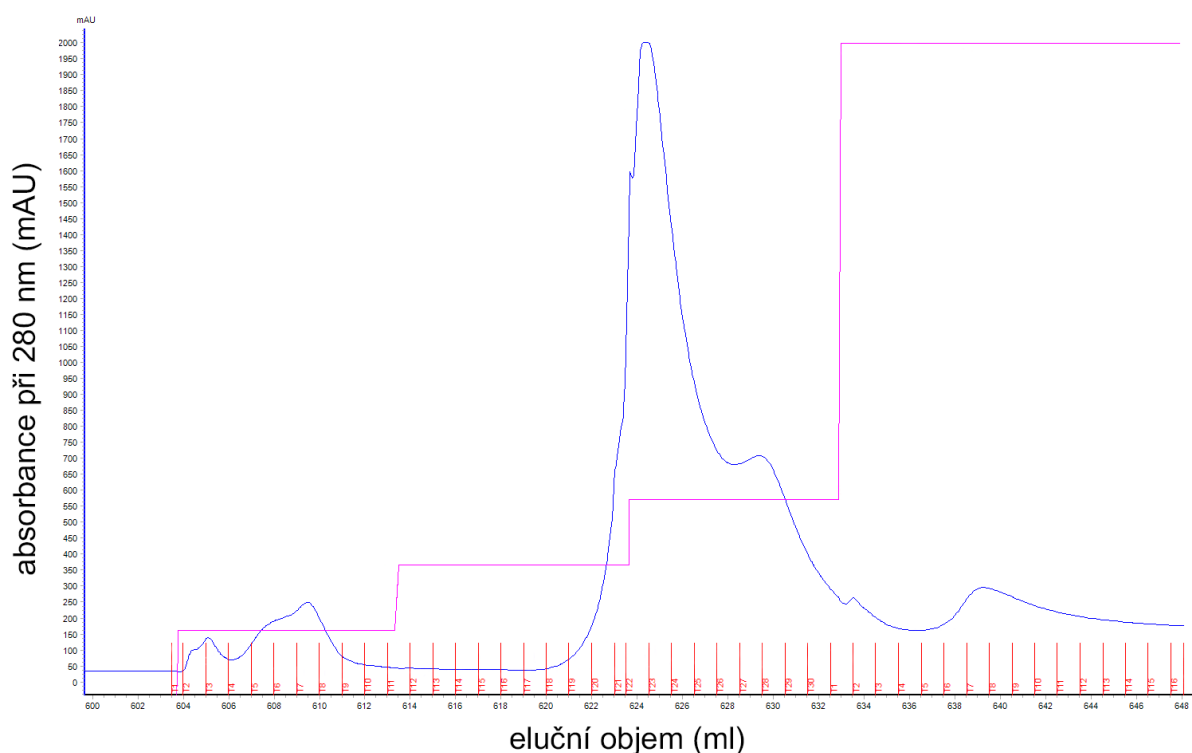
## 5.2 NtGGPPS4

### 5.2.1 Exprese proteinu NtGGPPS4

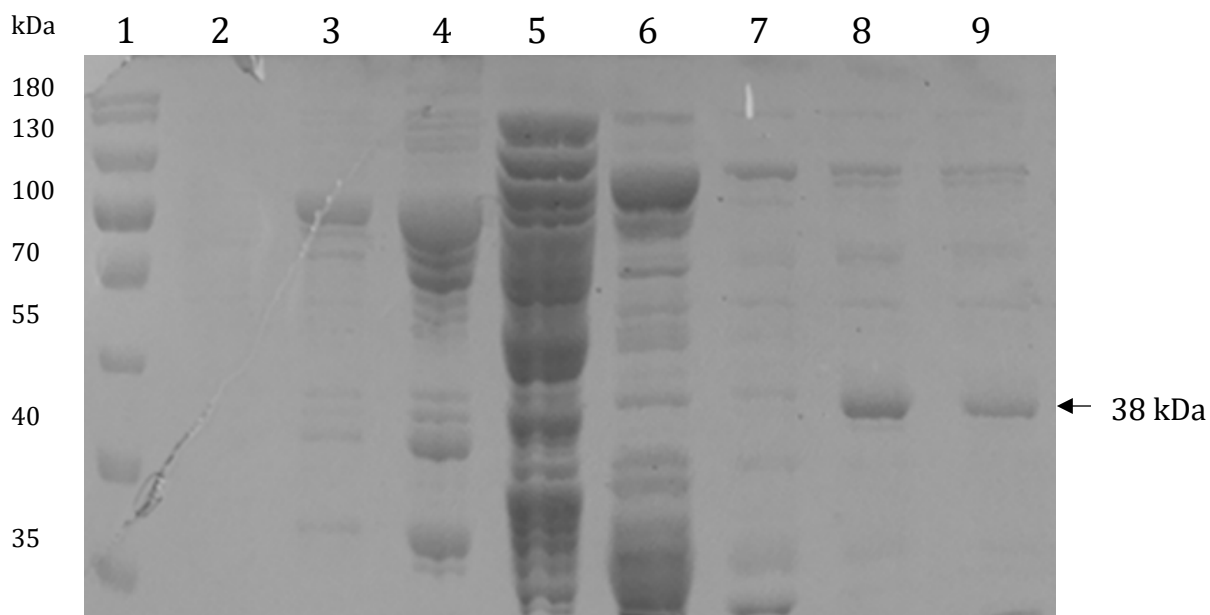
Kultivace bakterií *E. coli* (Lemo21(DE3)) s plasmidem pRSFDuet\_NtGGPPS4 probíhala v 1,5 l autoindukčního média a centrifugací bylo získáno 52 g biomasy. Lyze probíhala sonikací v prostředí lysozymu dle metody popsané v kapitole 4.2.

### 5.2.2 Purifikace proteinu NtGGPPS4

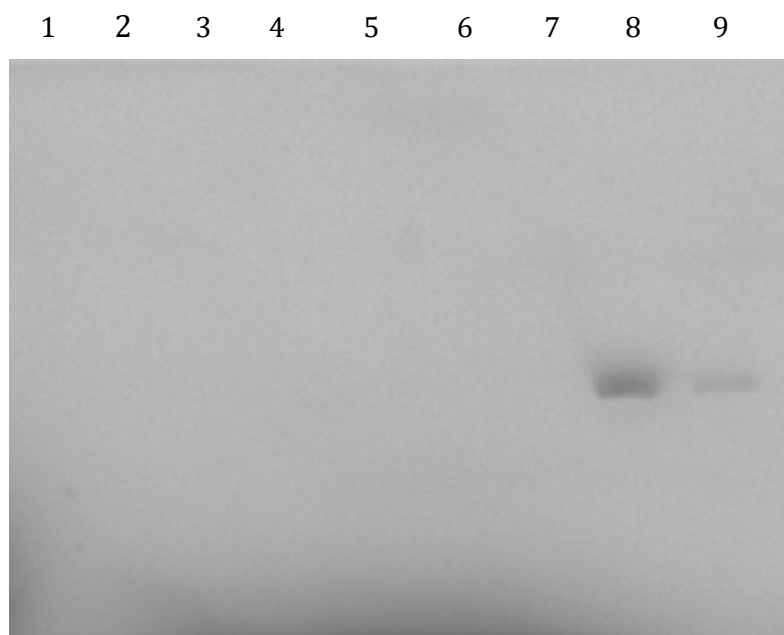
Protein NtGGPPS4 v lyzátu byl purifikován metodou afinitní chromatografie (viz kapitola 4.5) na systému ÄKTA start (Obrázek 10). Získané frakce byly analyzovány pomocí metody SDS-PAGE a Western blot (Obrázek 11 a 12).



**Obrázek 10:** Chromatogram průběhu purifikace proteinu NtGGPPS4. Na ose x je vyneseny eluční objem (ml) a označení frakcí, na ose y je hodnota absorbance při 280 nm (mAU). Modrá křivka – naměřená hodnota absorbance v závislosti na čase, fialová křivka vyznačuje gradient elučního pufru (0–100 %). Systém a podmínky: ÄKTA start, kolona HisTrap HP 5 ml, mobilní fáze – odmývací a eluční pufr, průtok 1 ml za minutu.



**Obrázek 11:** 10% polyakrylamidový obarvený gel s vzorky z afinitní chromatografie proteinu NtGGPPS4 (molekulová hmotnost proteinu 38,1 kDa). Popisky drah: **1** - proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **2** - frakce 3; **3** - frakce 6; **4** - frakce 7; **5** - frakce 23; **6** - frakce 27; **7** - frakce 32; **8** - frakce 37; **9** - frakce 38



**Obrázek 12:** Snímek chemiluminescenčního signálu na PVDF membráně během detekce proteinu NtGGPPS4 metodou Western blot. Popisky drah: **1** - proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **2** - frakce 3; **3** - frakce 6; **4** - frakce 7; **5** - frakce 23; **6** - frakce 27; **7** - frakce 32; **8** - frakce 37; **9** - frakce 38

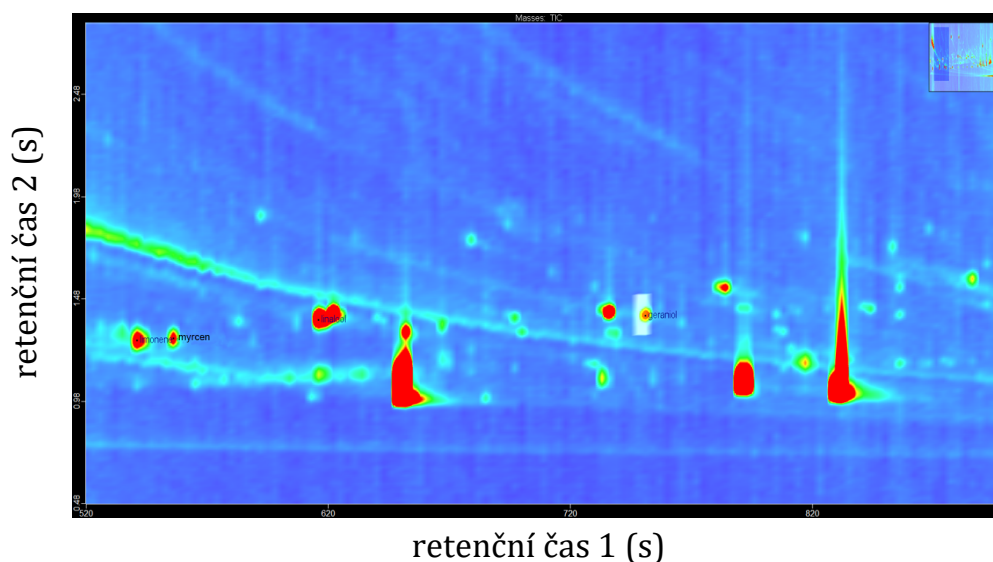
V dráze číslo 2 není zřetelný žádný signál. Dráhy 3 až 7 obsahující velké množství bakteriálních proteinů a pomocí chemické detekce v nich nebyl nalezen signál. V dráze číslo 8 a 9 je na obarveném gelu vidět zřetelný proužek odpovídající hmotnosti proteinu NtGGPPS4, což je potvrzeno detekcí chemického signálu pomocí metody Western blot.

Vzorek frakce obsahuje menší množství kontaminujících proteinů. Jako vzorek proteinu pro další experimenty byla použita frakce 37.

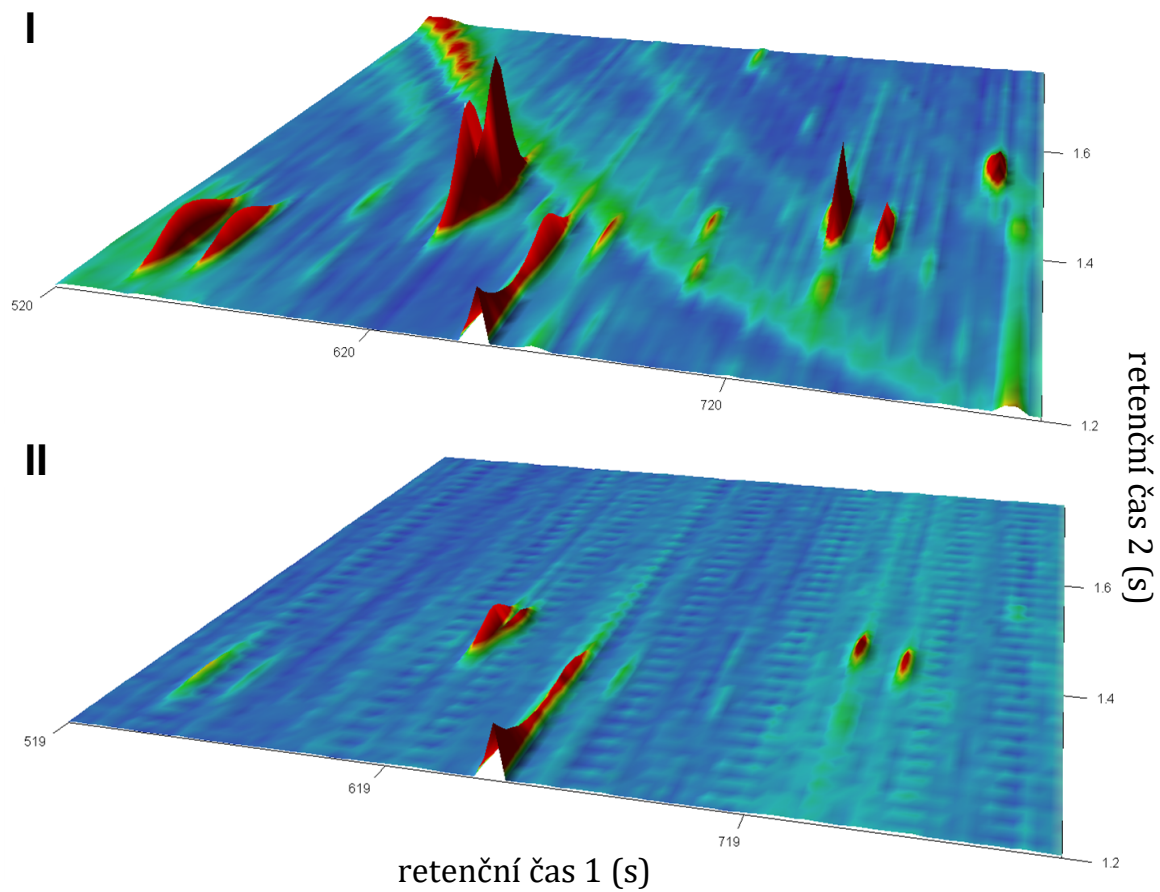
### 5.2.3 Měření aktivity

Vzorek proteinu byl inkubován s prekurzorem geranylpyrofosfátem dle metody popsané v kapitole 4.9. Měření vzniklých produktů proběhlo na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem (GC×GC-TOF-MS Pegasus 4D) metodou popsanou v kapitole 4.9.2.

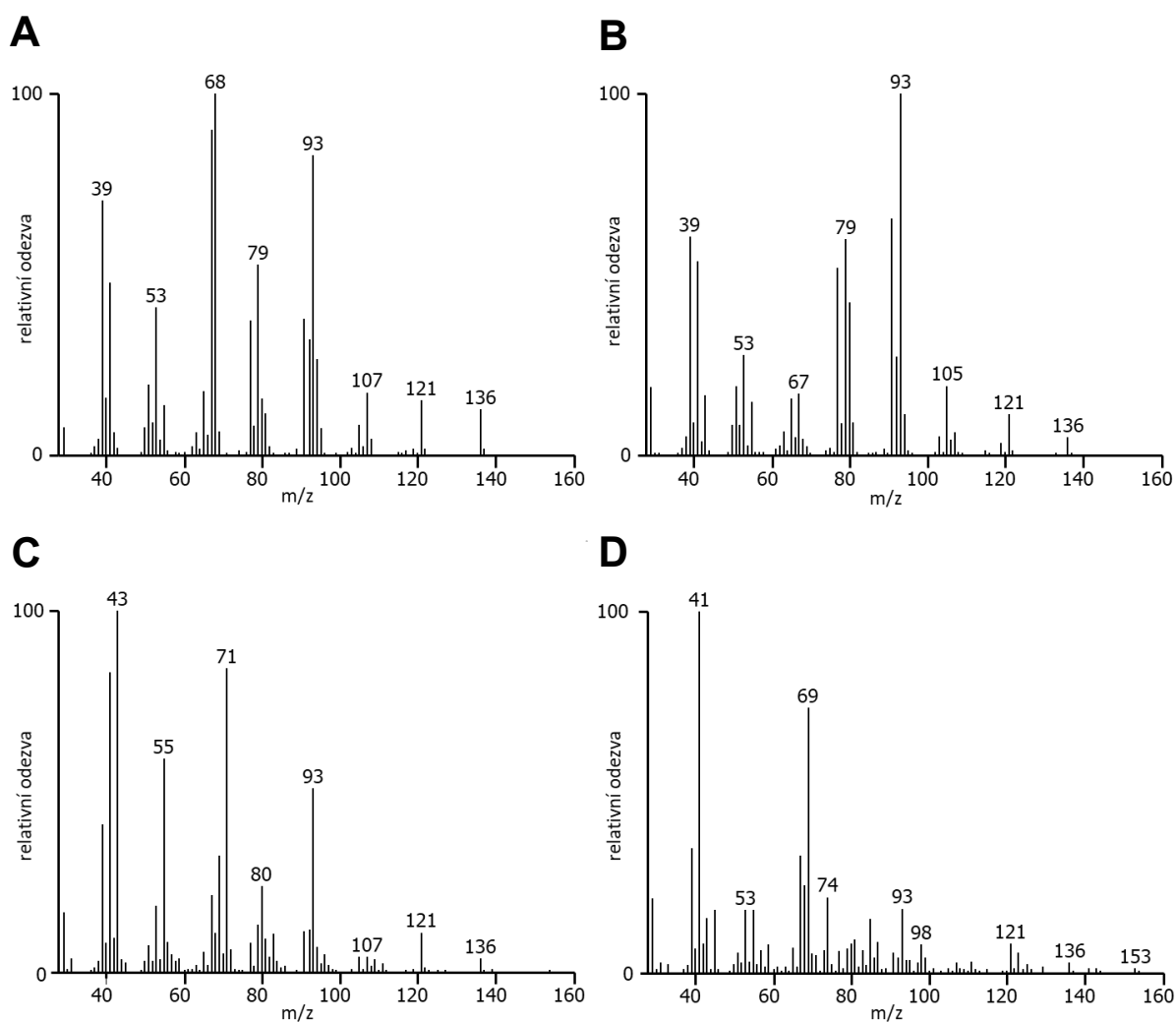
Při prvním měření bylo detekováno několik píků (Obrázek 13,14), jejichž hmotnostní spektra odpovídala monoterpenickým látkám – limonen, myrcen, linalool a geraniol (Obrázek 15). Hmotnostní spektra byla porovnávána s knihovnou Národního institutu standardů a technologie (NIST) [65]. Při opakovaném měření nebyly terpenické produkty detekovány a nepodařilo se tak prokázat terpensynthasovou aktivitu proteinu NtGGPPS4.



**Obrázek 13:** Chromatogram z plynové chromatografie. Osa x – retenční čas 1, osa y – retenční čas 2. Systém: GC×GC-TOF-MS Pegasus 4D BT. Primární kolona – Rxi-5MS. Sekundární kolona – Rxi-15MS (kapitola 4.9.2)



**Obrázek 14:** Srovnání GCxGC měření, **I:** NtGGPPS4 se substrátem geranylpyrofosfátem, **II:** Negativní kontrola. Osa x – retenční čas 1, osa y – retenční čas 2, osa z – odezva signálu. Systém: GC×GC-TOF-MS Pegasus 4D BT. Primární kolona – Rxi-5MS. Sekundární kolona – Rxi-15MS (kapitola 4.9.2)



**Obrázek 15:** Naměřená hmotnostní spektra, podle nichž byl vyhodnocen terpenový produkt **A:** limonen, **B:** myrcen, **C:** linalool, **D:** geraniol. Systém: GC×GC-TOF-MS Pegasus 4D BT. Primární kolona – Rxi-5MS. Sekundární kolona – Rxi-15MS (kapitola 4.9.2)

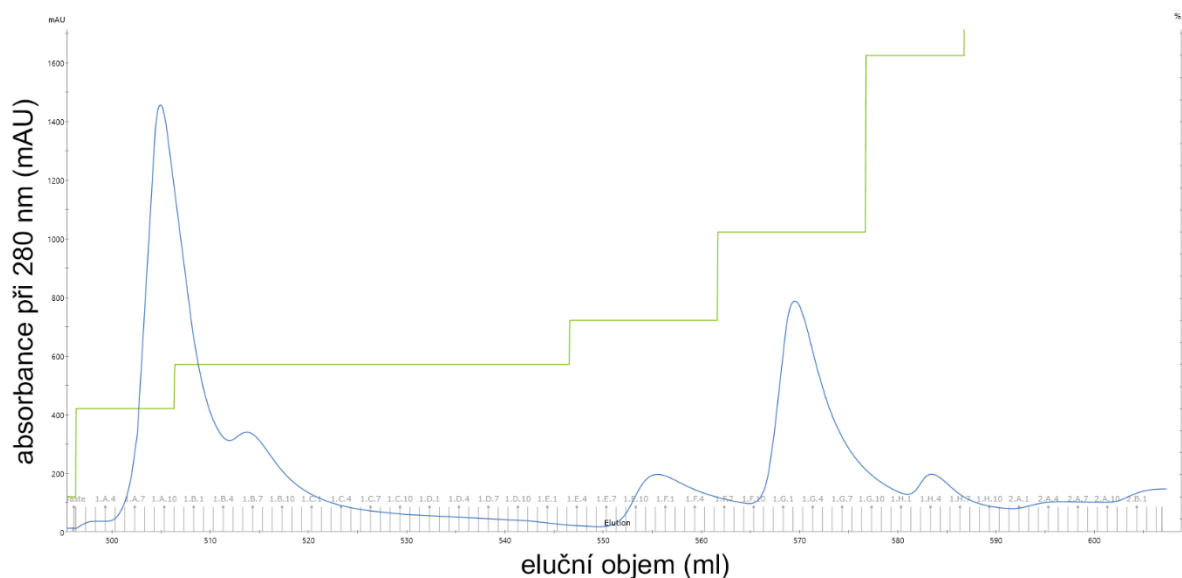
## 5.3 NtGGPPS6

### 5.3.1 Exprese proteinu NtGGPPS6

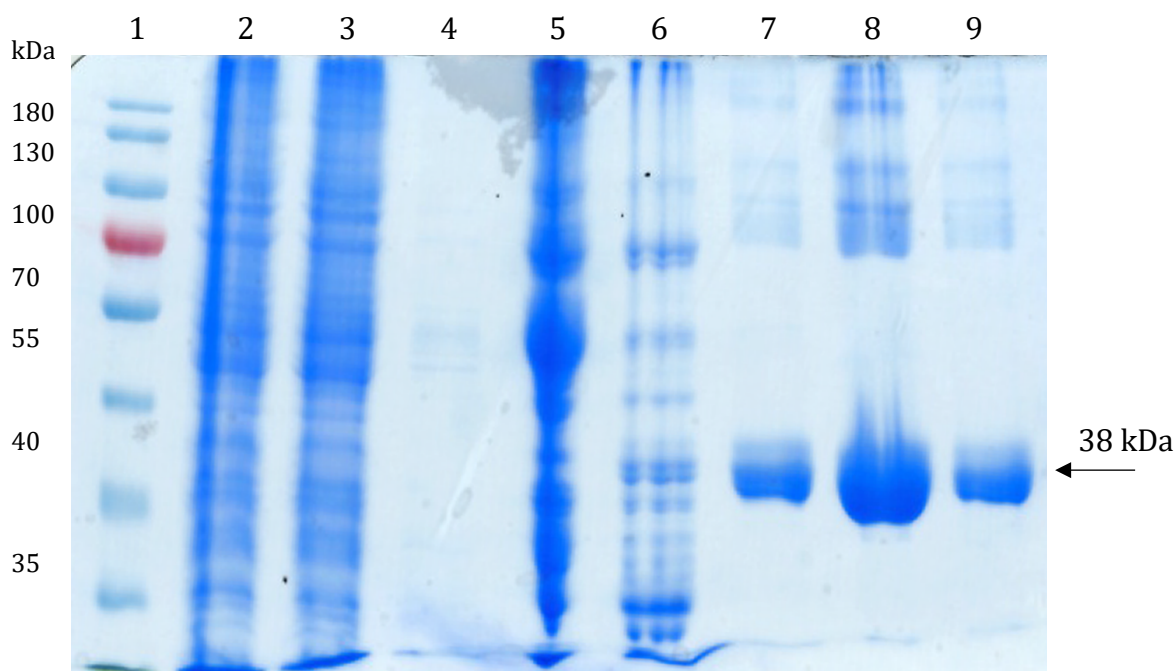
Kultivace buněčné kultury s plasmidem pRSFDuet\_NtGGPPS6 obsahující sekvenci kódující protein NtGGPPS6 byla provedena dle metody v kapitole 4.1. Z 2,5 l média bylo centrifugací získáno 82 g buněčné biomasy. Cílem experimentu bylo získat velké množství proteinu pro krystalizaci, nikoliv jako v předchozích případech funkční charakterizace proteinu. Pro expresi byly použity zásoba buněk v glycerolu, která byla již v minulosti pro expresi proteinu NtGGPPS6 otestována. Z toho důvodu nebyla provedena kontrola přítomnosti proteinu v supernatantu a peletu lyzátu. Lyze buněk byla provedena pomocí homogenizátoru Emulsiflex (kapitola 4.2).

### 5.3.2 Purifikace proteinu NtGGPPS6

Protein NtGGPPS6 v lyzátu byl purifikován metodou afinitní chromatografie (viz kapitola 4.5) za použití systému ÄKTA Pure (Obrázek 16). Získané eluční frakce s proteiny byly analyzovány metodou SDS-PAGE a Western blot (kapitola 4.3 a 4.4) (Obrázek 17 a 18).

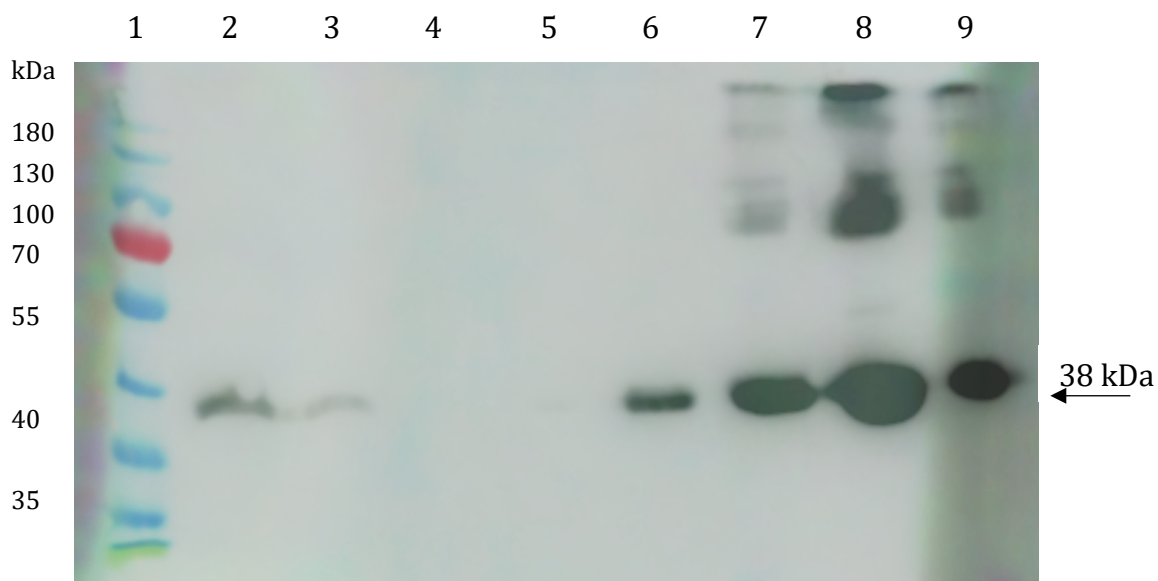


**Obrázek 16:** Chromatogram průběhu afinitní chromatografie při purifikaci proteinu NtGGPPS6. Osa x – eluční objem (ml) s označenými frakcemi, levá osa y – absorbance při 280nm (mAU), pravá osa y – gradient (%) elučního pufru. Modrá křivka – naměřená absorbance v závislosti na elučním objemu, zelená křivka – gradient elučního pufru. Systém a podmínky: ÄKTA Pure, kolona HisTrap HP 5 ml, mobilní fáze – odmyvací a eluční pufr, průtok 1 ml za minutu.



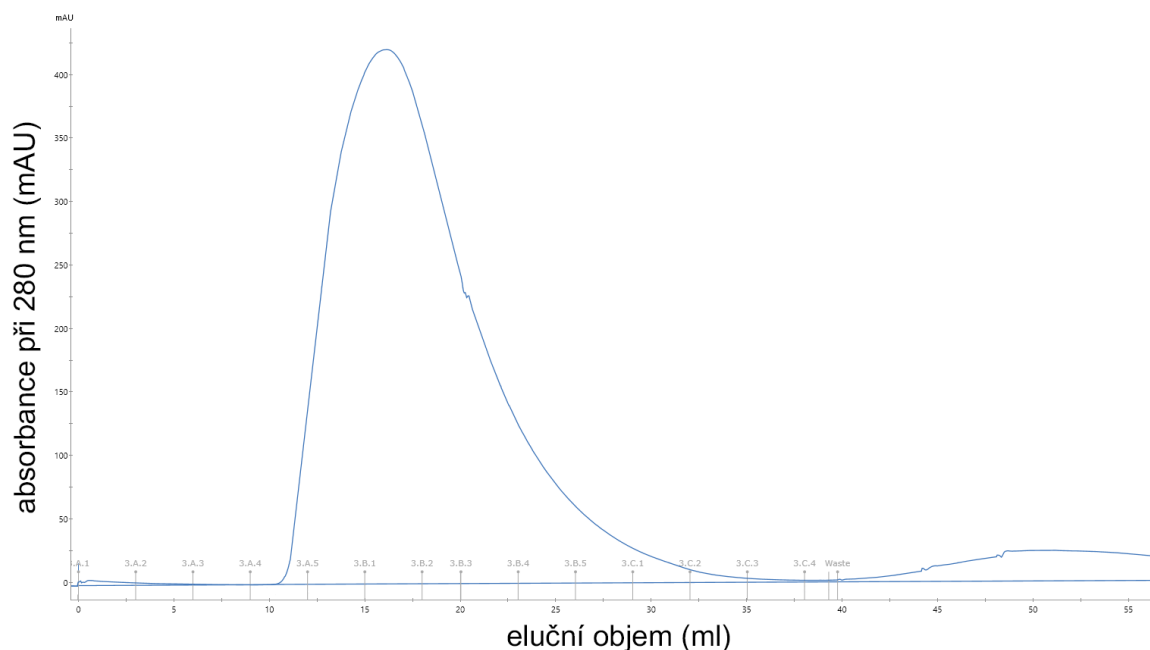
**Obrázek 17:** Analýza proteinu NtGGPPS6 nesoucího histidinovou kotvu (molekulová hmotnost proteinu 38,0 kDa) metodou SDS-PAGE. Objem dávkovaného vzorku 10  $\mu$ l. Popisky drah: **1** – Proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **2** – vzorek dávkovaný na kolonu; **3** – vzorek nezachycených proteinů; **4** – proteiny uvolněné během omývání kolony; **5** – frakce 1A9; **6** – frakce 1B6; **7** – frakce 1E12; **8** – frakce 1G2; **9** – frakce 1H4





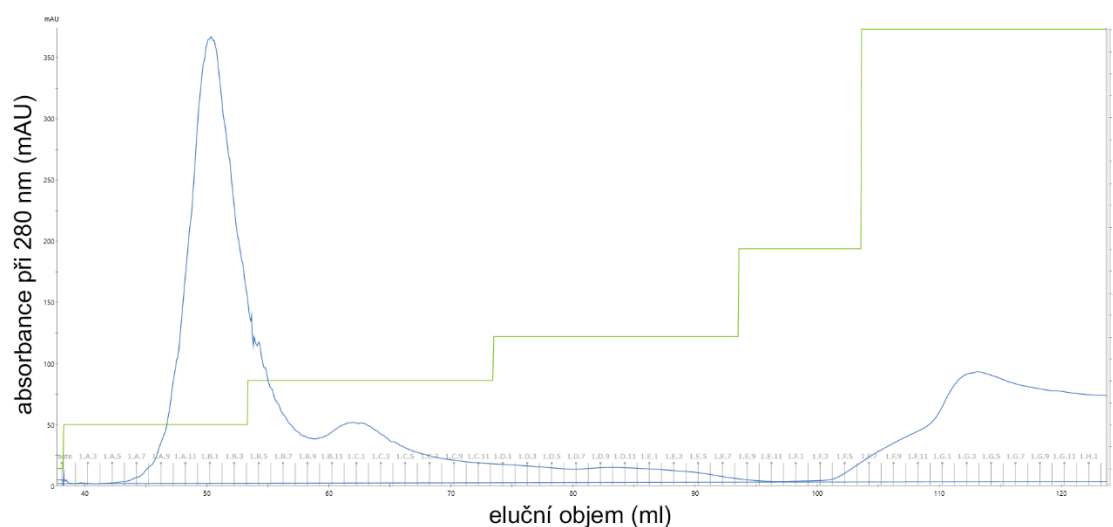
**Obrázek 18:** Imunodetekce proteinu NtGGPPS6 metodou Western blot. Objem dávkovaného vzorku 10  $\mu$ l. Popisky drah: **1** – Proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; **2** – vzorek dávkovaný na kolonu; **3** – vzorek nezachycených proteinů; **4** – proteiny uvolněné během omývání kolony; **5** – frakce 1A9; **6** – frakce 1B6; **7** – frakce 1E12; **8** – frakce 1G2; **9** – frakce 1H4

Frakce, ve kterých byl detekován protein NtGGPPS6, byly spojeny a separovány od solí pomocí metody gelové permeační chromatografie (kapitola 4.6) (Obrázek 19). Díky separaci mohlo být u frakcí obsahující rekombinantní protein přistoupeno ke štěpení a následně reverzní chromatografii, kde by vyšší koncentrace imidazolu znemožňovala provést metodu.



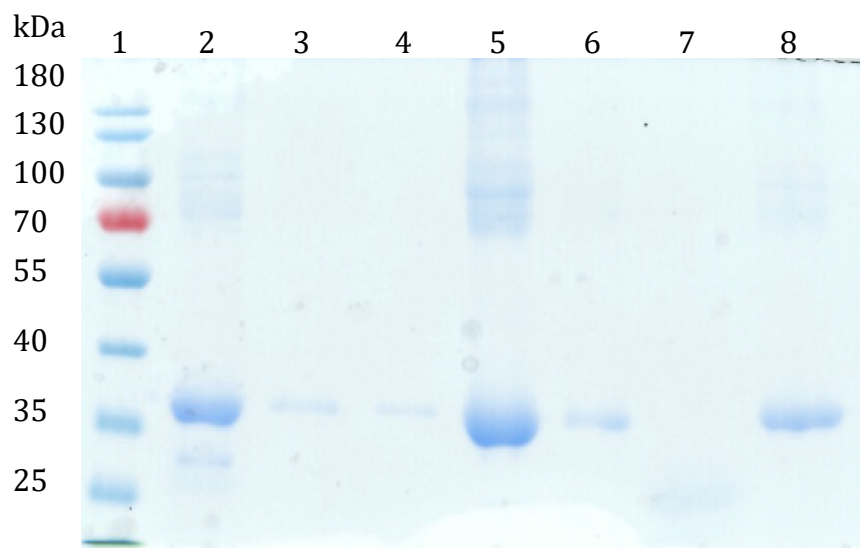
**Obrázek 19:** Chromatogram z gelové permeační chromatografie. Osa x – eluční objem (ml) s označenými frakcemi, osa y – naměřená hodnota absorbance (mAU). Systém a podmínky: ÄKTA Pure, kolona HiPrep 26/10 Desalting, mobilní fáze – odmývací pufr, průtok 1 ml za minutu.

Po separaci proteinu od solí byla do vzorku proteinu přidána TEV proteasa a směs byla inkubována (kapitola 4.7). Následující den byl vzorek purifikován reverzní afinitní chromatografií (kapitola 4.8) (Obrázek 20).



**Obrázek 20:** Chromatogram z reverzní afinitní chromatografie proteinu NtGGPPS6. Osa x – eluční objem (ml) s označenými frakcemi, levá osa y – absorbance při 280nm (mAU), pravá osa y – gradient (%) elučního pufru. Modrá křivka – naměřená absorbance v závislosti na elučním objemu, zelená křivka – gradient elučního pufru. Systém a podmínky: ÅKTA Pure, kolona HisTrap HP 5 ml, mobilní fáze – odmývací a eluční pufr, průtok 1 ml za minutu.

Eluce proteinu proběhla ve dvou pících. Separace od TEV proteasy a odštěpených histidinových kotev proběhla díky rozdílné afinitě k nikelnatým iontům v koloně. Frakce byly analyzovány metodou SDS-PAGE (kapitola 4.3).



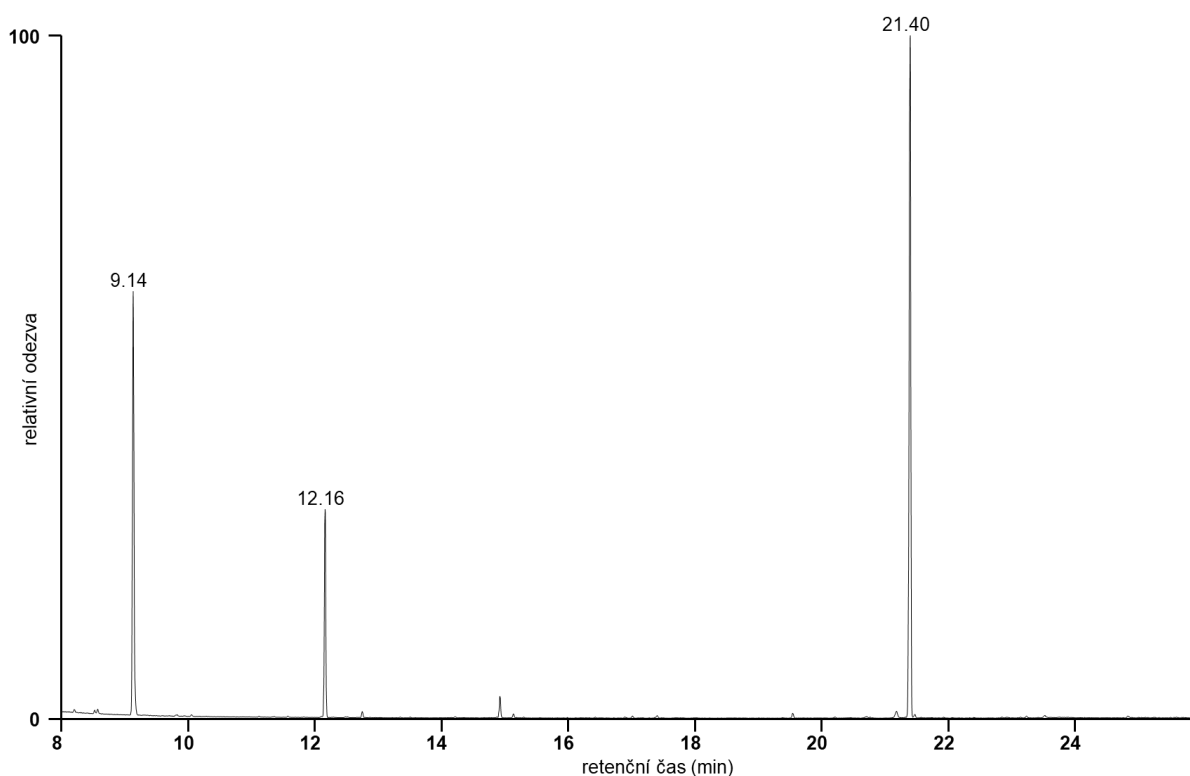
**Obrázek 21:** 10% polyakrylamidový obarvený gel s vzorky z reverzní afinitní chromatografie proteinu NtGGPPS6. Popisky drah: 1 - proteinový standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2 - vzorek dávkovaný na kolonu; 3 - nezachycený vzorek na koloně; 4 - uvolněný vzorek během oplachu; 5 - frakce 1B1; 6 - frakce 1C1; 7 - frakce 1G1; 8 - vzorek sjednocených frakcí 1A7 – 1C12

Frakce 1A7 – 1C12 byly spojeny a pomocí spektrofotometru (NanoDrop One, Thermo Scientific) byla orientační koncentrace proteinu NtGGPPS6 stanovena na 1,48 mg/ml.

Měření probíhalo při 280 nm s předpokladem, že vzhledem k nízkému množství kontaminujících proteinů odpovídá absorbance primárně purifikovanému proteinu. Pro měření byl použit molární extinční koeficient ( $\epsilon = 44600$ ), jehož teoretická hodnota byla vypočtena pomocí webového nástroje *Expasy - ProtParam* (dostupné z <https://web.expasy.org/protparam>).

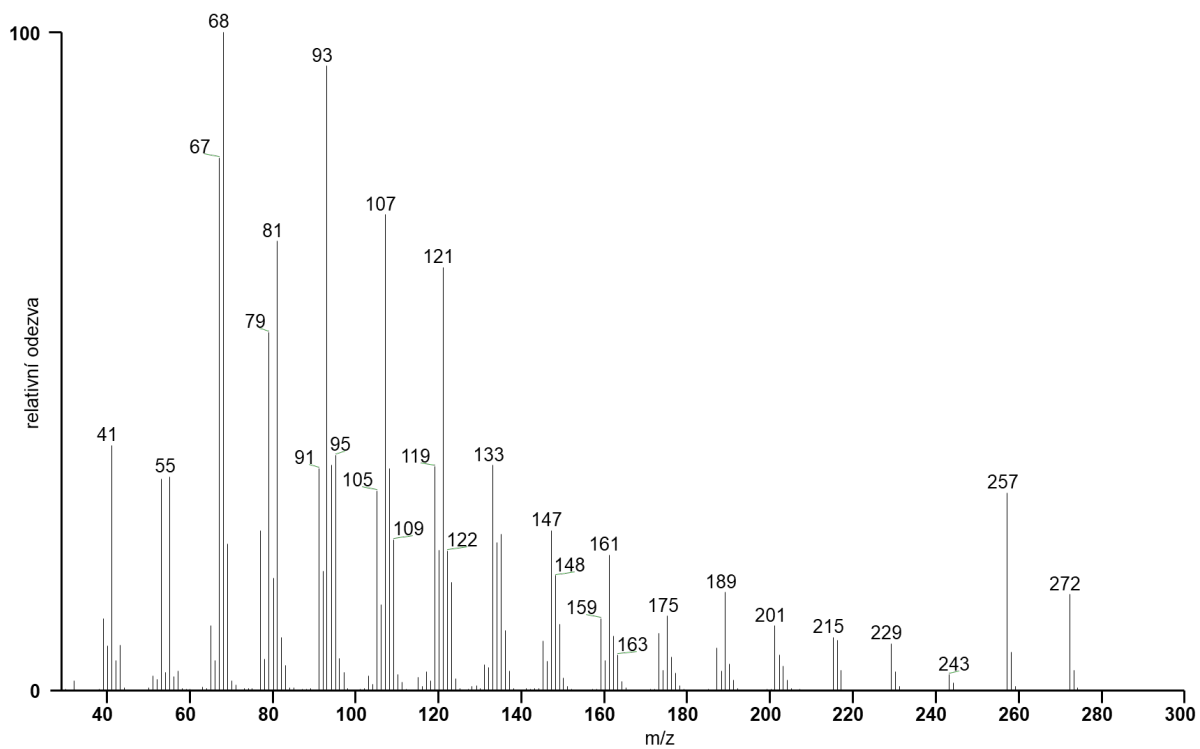
### 5.3.3 Měření aktivity

Vzorek proteinu NtGGPPS6 byl inkubován s geranylgeranylpyrofosfátem dle metody popsané v kapitole 4.9. Měření vzniklých produktů v inkubované směsi probíhalo na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem TRACE 1310 ISQ, metoda je popsána v kapitole 4.9.1. Měření zahrnovalo negativní kontrolou, ve které nebyl detekován signál daného diterpenu.



**Obrázek 22:** Chromatogram z měření proteinu NtGGPPS6 s prekurzorem geranylgeranylpyrofosfátem. Systém: Plynový chromatograf TRACE 1310 ve spojení s hmotnostním detektorem ISQ LT. Kolona - TG-5MS (viz kapitola 4.9.1).

V retenčním čase 21,4 min byl detekován pík (Obrázek 22), který byl na základě hmotnostního spektra (Obrázek 23, strana 38) po srovnání s knihovnou Národního institutu standardů a technologie (NIST) identifikován jako diterpen neocembren [65]. Opakovaná měření prokázala stejný výsledek.



**Obrázek 23:** Naměřená hmotnostní spektra píku v retenčním čase 21,37 – 21,41 min. Systém: Plynový chromatograf TRACE 1310 ve spojení s hmotnostním detektorem ISQ LT. Byla použita kolona TG-5MS (viz kapitola 4.9.1).

## 6 Diskuse

V rámci této bakalářské práce byla provedena exprese a purifikace tří rekombinantních proteinů, které patří do skupiny domnělých terpensynthas, původem z *N. takasagoensis* [48,62]. Cíl exprese NtGGPPS6 byl splněn, kdy byla ověřena TPS aktivita a bylo získáno dostatečné množství proteinu pro budoucí experimenty s krystalizací proteinu. Detekovaný produkt enzymu neocembren je dle navržené biosyntetické dráhy [61,66] základní skelet pro vznik polycyklických diterpenů, které jsou detekovány u vojáků *N. takasagoensis* (viz Obrázek 4, strana 13). Enzym s TPS aktivitou NtGGPPS6 tedy zřejmě hraje klíčovou roli při syntéze strukturně složitějších diterpenických látek. U NtGGPPS4 a NtGGPPS2-B nebyla prokázána TPS aktivita, což může být způsobeno celou škálou faktorů.

Při prvotním měření aktivity proteinu NtGGPPS4 s geranylpyrofosfátem byly detekovány vzniklé monoterpeny. Výsledky nicméně nebyly reprodučibilní. Jedním z vysvětlení je denaturace proteinu ve vzorku opakovaným rozmražením z  $-80^{\circ}\text{C}$ . Inkubace proteinu probíhala v uzavřené skleněné vialce, čímž se dá vyloučit vnější kontaminace. Absorbent (SPME vlákno) byl před použitím pročištěn, a tedy dá se vyloučit kontaminace z absorbentu. U rekombinantního proteinu NtGGPPS2-B nebyla detekována žádná aktivita.

Experimenty ověřující TPS aktivitu probíhaly v prostředí MOPS pufru s hořečnatými ionty, v souladu s tím, že většina známých enzymů využívá právě hořečnaté ionty. Existují i práce, kde funkční charakterizace rostlinných monoterpensynthas probíhala v pufru s  $\text{Mn}^{2+}$  [67]. U IDS enzymu brouka *Phaedon cochleariae* byl testován efekt přítomnosti hořečnatých, manganatých, nebo kobaltnatých iontů na poměr vznikajících produktů GPP a FPP [68]. Nedá se proto vyloučit, že proteiny NtGGPPS2-B a NtGGPPS4 vyžadují pro TPS aktivitu jiné dvoumocné ionty než  $\text{Mg}^{2+}$ .

Použité sekvence pro tvorbu rekombinantních proteinů vycházejí z výzkumu, který se zabýval transkripty do mRNA v lokalizované v hlavě termitího vojáka [62]. Je možné, že u sekvencí kódující proteiny NtGGPPS2-B a NtGGPPS4 dochází pouze k transkripci a nedochází k následné translaci mRNA a tyto geny nemají žádnou funkci.

Další z možných příčin je problém během exprese proteinu. Sekvence vložené do plasmidů (NtGGPPS4, NtGGPPS2-B) byly původně optimalizované pro expresi v *S. cerevisiae*. Následkem toho mohlo dojít k nižší míře exprese rekombinantního proteinu nebo expresi pouze N-terminálních fragmentů NtGGPPS4 v *E. coli* (kmen Lemo21(DE3)) kvůli nevhodné kodonové optimalizaci. Nízká míra exprese mohla způsobit komplikace i během purifikace.

Purifikace proteinů exprimovaných s histidinovou kotvou probíhala pomocí afinitní chromatografie s vázanými kovovými ionty. Z analýzy frakcí s exprimovaným proteinem NtGGPPS4 (kapitola 5.2.2) je zřetelné, že se na koloně zachytily i bakteriální proteiny, které byly uvolněny společně s exprimovaným proteinem. To je způsobeno nižší mírou exprese rekombinantního proteinu, což může umožnit vazbu vyššího množství bakteriálních proteinů na kolonu. U vzorku NtGGPPS4 mohla tedy mít na měření aktivity negativní vliv nižší koncentrace proteinu spojená s kontaminací bakteriálními proteiny

S ohledem na tyto zkušenosti při expresi NtGGPPS4 probíhaly následné exprese NtGGPPS2-B a NtGGPPS6 v bakteriích *E. coli* kmenu LOBSTR-BL21(DE3)-RIL. Tento kmen byl vytvořen zejména kvůli snaze snížit kontaminaci bakteriálními proteiny, které negativně ovlivňují purifikační metody založené na základě interakce nikelnatých iontů a histidinové kotvy [69]. Z analýzy purifikovaných frakcí (kapitola 5.1.2 a 5.3.2) je zřejmé, že frakce jsou čistší, nicméně navzdory lépe purifikovaným frakcím nebyla u NtGGPPS2-B detekována žádná TPS aktivita.

Po vyloučení výše zmíněných faktorů je dále na místě zvážit vhodnost zvoleného expresního systému. Bakterie *E. coli* nejsou schopny všech posttranslačních modifikací, které probíhají v živočišných buňkách, protein zároveň nemusí být správně sbalen. Exprimovaný protein by v takové situaci nemusel být funkčním enzymem.

Další možným zdrojem problému je kvartérní struktura proteinu. O studovaných proteinech se dosud nic neví a jejich krystalová struktura není vyřešená. Kvůli tomu není zcela jasné, zdali jsou proteiny monomerní, či oligomerní, případně homomerní či heteromerní. Pakliže se vyloučí ostatní možné vlivy, pak by za odůvodněním nízké či nulové TPS aktivity stál chybějící zbytek proteinového komplexu. Vzhledem k extensivní duplikaci GGPPS genů u *N. takasagoensis* se nabízí, že by se kvartérní struktura se skládala z dvojice různých paralogů NtGGPPS.

## 7 Závěr

V bakteriálních systémech byla provedena exprese tří rekombinantních proteinů. Purifikací byly připraveny vzorky proteinu NtGGPPS2-B, NtGGPPS4 a NtGGPPS6. Terpensynthasová aktivita byla zjištěna pouze u proteinu NtGGPPS6, u proteinu NtGGPPS4 byla zjištěna možná aktivita během prvotního měření, nicméně opakovaným měřením se aktivitu prokázat nepodařilo. Během měření proteinu NtGGPPS2-B nebyly detekovány žádné terpenické produkty. Byl získán proteinový vzorek NtGGPPS6, který bude použit pro krystalizační experimenty.

## 8 Seznam použité literatury

1. Christianson, D.W.: Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chem Rev* **117**:17, 11570–648 (2017).
2. Müller, M.; Buchbauer, G.: Essential oil components as pheromones. A review. *Flavour Fragr J* **26**:6, 357–77 (2011).
3. Zhao, L.; Chang, W.; Xiao, Y.; Liu, H.; Liu, P.: Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **82**, 497–530 (2013).
4. Zhang, F.L.; Casey, P.J.: Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**, 241–69 (1996).
5. Bentinger, M.; Tekle, M.; Dallner, G.: Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 74–79 (2010).
6. Unsicker, S.B.; Kunert, G.; Gershenzon, J.: Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr Opin Plant Biol* **12**:4, 479–85 (2009).
7. War, A.R.; Paulraj, M.G.; Ahmad, T.; Buhroo, A.A.; Hussain, B.; Ignacimuthu, S.; Sharma, H.C.: Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav* **7**:10, 1306–20 (2012).
8. Mumm, R.; Hilker, M.: Direct and indirect chemical defence of pine against folivorous insects. *Trends Plant Sci* **11**:7, 351–58 (2006).
9. Weston-Green, K.; Clunas, H.; Jimenez Naranjo, C.: A review of the potential use of pinene and linalool as terpene-based medicines for brain health: Discovering novel therapeutics in the flavours and fragrances of *Cannabis*. *Front Psychiatry* **12**:583211 (2021).
10. Sharifi-Rad, J.; Quispe, C.; Patra, J.K.; Singh, Y.D.; Panda, M.K.; Das, G.; Adetunji, C.O.; Michael, O.S.; Sytar, O.; Polito, L.; Živković, J.; Cruz-Martins, N.; Klimek-Szczykutowicz, M.; Ekiert, H.; Choudhary, M.I.; Ayatollahi, S.A.; Tynybekov, B.; Kobarfard, F.; Muntean, A.C.; Grozea, I.; Daştan, S.D.; Butnariu, M.; Szopa, A.; Calina, D.: Paclitaxel: Application in modern oncology and nanomedicine-based cancer therapy. *Oxid Med Cell Longev* **2021**:3687700 (2021).
11. Orosco, F.; Quimque, M.: Antiviral potential of terpenoids against major viral infections: Recent advances, challenges, and opportunities. *J Adv Biotechnol Exp Ther* **7**:1, 221–238 (2024).
12. Lange, B.M.; Ahkami, A.: Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes—current status and future opportunities. *Plant Biotechnol J* **11**:2, 169–96 (2013).
13. Krishna, S.; Bustamante, L.; Haynes, R.K.; Staines, H.M.: Artemisinin: their growing importance in medicine. *Trends in Pharmacol Sci* **29**:10, 520–27 (2008).



14. Peralta-Yahya, P.P.; Zhang, F.; Del Cardayre, S.B.; Keasling, J.D.: Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature* **488**, 320–28 (2012).
15. Zhang, Y.; Song, X.; Lai, Y.; Mo, Q.; Yuan, J.: High-yielding terpene-based biofuel production in *Rhodobacter capsulatus*. *ACS Synth Biol* **10**:6, 1545–52 (2021).
16. Ninkuu, V.; Zhang, L.; Yan, J.; Fu, Z.; Yang, T.; Zeng, H.: Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *Int J Mol Sci* **22**:11, 5710 (2021).
17. Perveen, S.: Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids, In: *1. Terpenes and Terpenoids*. London: IntechOpen, 2018, str. 1-12. ISBN 978-1-78984-777-2
18. Masyita, A.; Mustika Sari, R.; Dwi Astuti, A.; Yasir, B.; Rahma Rumata, N.; Emran, T.B.; Nainu, F.; Simal-Gandara, J.: Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chem X* **13**:100217 (2022).
19. Kopaczyk, J.M.; Warguła, J.; Jelonek, T.: The variability of terpenes in conifers under developmental and environmental stimuli. *Environ Exp Bot* **180**:104197 (2020).
20. Schwechheimer, C.: Gibberellin signaling in plants – The extended version. *Front Plant Sci* **2**:107 (2012).
21. Goodman, D.S.; Huang, H.S.; Shiratori, T.: Mechanism of the biosynthesis of vitamin A from  $\beta$ -carotene. *J Biol Chem* **241**:9, 1929–32 (1966).
22. Tholl, D.; Rebholz, Z.; Morozov, A.V.; O'Maille, P.E.: Terpene synthases and pathways in animals: enzymology and structural evolution in the biosynthesis of volatile infochemicals. *Nat Prod. Rep* **40**:4, 766–93 (2023).
23. Kasahara, H.; Hanada, A.; Kuzuyama, T.; Takagi, M.; Kamiya, Y.; Yamaguchi, S.: Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**:47, 45188–94 (2002)
24. Vinokur, J.M.; Korman, T.P.; Cao, Z.; Bowie, J.U.: Evidence of a novel mevalonate pathway in Archaea. *Biochemistry* **53**:23, 4161–68 (2014).
25. Dellas, N.; Thomas, S.T.; Manning, G.; Noel, J.P.: Discovery of a metabolic alternative to the classical mevalonate pathway. *eLife* **2**:e00672 (2013).
26. Poulter, C.D.: Farnesyl diphosphate synthase. A paradigm for understanding structure and function relationships in E-polyprenyl diphosphate synthases. *Phytochem Rev* **5**:1, 17–26 (2006).
27. Whitehead, J.N.; Leferink, N.G.H.; Johannissen, L.O.; Hay, S.; Scrutton, N.S.: Decoding catalysis by terpene synthases. *ACS Catal* **13**:19, 12774–802 (2023).
28. Ogura, K.; Koyama, T.: Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem Rev* **98**:4, 1263–76 (1998).

29. Tarshis, L.C.; Proteau, P.J.; Kellogg, B.A.; Sacchettini, J.C.; Poulter, C.D.: Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:26, 15018–23 (1996).
30. Davis, E.M.; Croteau, R.: Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes, In: *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*, Leeper, F.J. (Ed.); Vederas, J.C. (Ed.). Berlin: Springer, 2000, str 53–95. ISBN 978-3-540-48146-1
31. Bian, G.; Ma, T.; Liu, T.: In Vivo Platforms for terpenoid overproduction and the generation of chemical diversity, In: *Enzymes in Synthetic Biology. Methods in Enzymology*. Scrutton, N (Ed.). London: Academic Press, 2018, str. 97–129. ISBN 978-0-12-815148-8
32. Collu, G.; Unver, N.; Peltenburg-Looman, A.M.G.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R., Memelink, J.: Geraniol 10-hydroxylase1, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS Lett* **508**:2, 215–20 (2001).
33. Zhou, F.; Pichersky, E.: The complete functional characterisation of the terpene synthase family in tomato. *New Phytol* **226**:5, 1341–60 (2020).
34. Aaron, J.A.; Christianson, David.W.: Trinuclear metal clusters in catalysis by terpenoid synthases. *Pure Appl Chem* **82**:8, 1585–97 (2010).
35. Prestwich, G.D.; Jones, R.W., Collins, M.S.: Terpene biosynthesis by nasute termite soldiers (Isoptera: Nasutitermitinae). *Insect Biochem* **11**:3, 331–36 (1981).
36. Gilg, A.B.; Tittiger, C.; Blomquist, G.J.: Unique animal prenyltransferase with monoterpene synthase activity. *Naturwissenschaften* **96**:6, 731–35 (2009).
37. Beran, F.; Rahfeld, P.; Luck, K.; Nagel, R.; Vogel, H.; Wielsch, N.; Irmisch, S.; Ramasamy, S.; Gershenzon, J.; Heckel, D.G.; Köllner, T.G.: Novel family of terpene synthases evolved from trans-isoprenyl diphosphate synthases in a flea beetle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**:11, 2922–27 (2016).
38. Lancaster, J.; Khrimian, A.; Young, S.; Lehner, B.; Luck, K.; Wallingford, A.; Ghosh, S.K.B.; Zerbe, P.; Muchlinski, A.; Marek, P.E.; Sparks, M.E.; Tokuhisa, J.G.; Tittiger, C.; Köllner, T.G.; Weber, D.C.; Gundersen-Rindal, D.E.; Kuhar, T.P.; Tholl, D.: *De novo* formation of an aggregation pheromone precursor by an isoprenyl diphosphate synthase-related terpene synthase in the harlequin bug. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**:37, E8634–41 (2018).
39. Lancaster, J.; Lehner, B.; Khrimian, A.; Muchlinski, A.; Luck, K.; Köllner, T.G.; Weber, D.C.; Gundersen-Rindal, D.E.; Tholl, D.: An IDS-Type Sesquiterpene synthase produces the pheromone precursor (Z)- $\alpha$ -bisabolene in *Nezara viridula*. *J Chem Ecol* **45**:2, 187–97 (2019).
40. Rebholz, Z.; Lancaster, J.; Larose, H.; Khrimian, A.; Luck, K.; Sparks, M.E.; Gendreau, K.L.; Shewade, L.; Köllner, T.G.; Weber, D.C.; Gundersen-Rindal, D.E.; O'Maille, P.; Morozov, A.V.; Tholl, D.: Ancient origin and conserved gene function

- in terpene pheromone and defense evolution of stink bugs and hemipteran insects. *Insect Biochem Mol Biol* **152**:103879 (2023).
41. Zhou, Y.; Liu, X.; Yang, Z.: Characterization of terpene synthase from tea green leafhopper being involved in formation of geraniol in tea (*Camellia sinensis*) leaves and potential effect of geraniol on insect-derived endobacteria. *Biomolecules* **9**:12, 808 (2019).
  42. Darragh, K.; Orteu, A.; Black, D.; Byers, K.J.R.P.; Szczerbowski, D.; Warren, I.A.; Rastas, P.; Pinharanda, A.; Davey, J.W.; Fernanda Garza, S.; Abondano Almeida, D.; Merrill, R.M.; McMillan, W.O.; Schulz, S.; Jiggins, C.D.: A novel terpene synthase controls differences in anti-aphrodisiac pheromone production between closely related *Heliconius* butterflies. *PLoS Biol* **19**:1, e3001022 (2021).
  43. Ducker, C.; Baines, C.; Guy, J.; Euzébio Goulart Santana, A.; Pickett, J.A.; Oldham, N.J.: A diterpene synthase from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* produces the pheromone sobralene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **121**:12, e2322453121 (2024).
  44. Eggleton, P.; Tayasu, I.: Feeding groups, lifetypes and the global ecology of termites. *Ecol Res* **16**:5, 941–60 (2001).
  45. Jouquet, P.; Traoré, S.; Choosai, C.; Hartmann, C.; Bignell, D.: Influence of termites on ecosystem functioning. Ecosystem services provided by termites. *Eur J Soil Biol* **47**:4, 215–22 (2011).
  46. Eggleton, P.: An introduction to termites: Biology, taxonomy and functional morphology, In: *Biology of Termites: a Modern Synthesis*. Bignell, D.E. (Ed.); Roisin, Y. (Ed.); Lo, N. (Ed.). Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, str. 1-26. ISBN 978-90-481-3977-4.
  47. Snyder, T.E.: The biology of the termite castes. *Q Rev Biol* **1**:4, 522–52 (1926).
  48. Hojo, M.; Shigenobu, S.; Maekawa, K.; Miura, T.; Tokuda, G.: Duplication and soldier-specific expression of geranylgeranyl diphosphate synthase genes in a nasute termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Insect Biochem Mol Biol* **111**:103177 (2019).
  49. Brune, A.: Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat Rev Microbiol* **12**:3, 168–80 (2014).
  50. Otani, S.; Challinor, V.L.; Kreuzenbeck, N.B.; Kildgaard, S.; Krath Christensen, S.; Larsen, L.L.M.; Aanen, D.K.; Rasmussen, S.A.; Beemelmans, C.; Poulsen, M.: Disease-free monoculture farming by fungus-growing termites. *Sci Rep* **9**:8819 (2019).
  51. Mitaka, Y.; Akino, T. A: Review of Termite Pheromones: Multifaceted, context-dependent, and rational chemical communications. *Front Ecol Evol* **8**:595614 (2021).

52. Dolejšová, K.; Křivánek, J.; Kalinová, B.; Hadravová, R.; Kyjaková, P.; Hanus, R.: Sex-pairing pheromones in three sympatric neotropical termite species (Termitidae: Syntermitinae). *J Chem Ecol* **44**:6, 534–46 (2018).
53. Bordereau, C.; Pasteels, J.M.: Pheromones and chemical ecology of dispersal and foraging in termites. In: *Biology of Termites: a Modern Synthesis*. Bignell, D.E. (Ed.); Roisin, Y. (Ed.), Lo, N. (Ed.). Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, str. 279–320. ISBN 978-90-481-3977-4.
54. Dolejšová, K.; Křivánek, J.; Štáfková, J.; Horáček, N.; Havlíčková, J.; Roy, V.; Kalinová, B.; Roy, A.; Kyjaková, P.; Hanus, R.: Identification of a queen primer pheromone in higher termites. *Commun Biol* **5**:1, 1–11 (2022).
55. Šobotník, J.; Jirošová, A.; Hanus, R.: Chemical warfare in termites. *J Insect Physiol* **56**:9, 1012–21 (2010).
56. Prestwich, G.D.: Defense mechanisms of termites. *Annu Rev Entomol* **29**:1, 201–32 (1984).
57. Prestwich, G.D.; Collins, M.S.: A novel enolic  $\beta$ -ketoaldehyde in the defense secretion of the termite *Rhinotermes hispidus*. *Tetrahedron Lett* **21**:52, 5001–2 (1980).
58. Gössinger, E.: Chemistry of the secondary metabolites of termites. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 109*. Kinghorn, A.D. (Ed.); Falk, H. (Ed.); Gibbons, S. (Ed.); Kobayashi, J. (Ed.); Asakawa, Y. (Ed.); Liu, J.K. (Ed.). Cham: Springer Nature Switzerland, 2019, str. 1–384. ISBN 978-3-030-12857-9
59. Jirošová, A.; Jančařík, A.; Menezes, R.C.; Bazalová, O.; Dolejšová, K.; Vogel, H.; Jedlička, P.; Buček, A.; Brabcová, J.; Majer, P.; Hanus, R.; Svatoš, A.: Co-option of the sphingolipid metabolism for the production of nitroalkene defensive chemicals in termite soldiers. *Insect Biochem Mol Biol* **82**:6, 52–61 (2017).
60. Sobotník, J.; Hanus, R.; Kalinová, B.; Piskorski, R.; Cvacka, J.; Bourguignon, T.; Roisin, Y.: (E,E)-alpha-farnesene, an alarm pheromone of the termite *Prorhinotermes canalifrons*. *J Chem Ecol* **34**:4, 478–86 (2008).
61. Prestwich, G.D.: From tetracycles to macrocycles. *Tetrahedron* **38**:13, 1911–19 (1982).
62. Hojo, M.; Matsumoto, T.; Miura, T.: Cloning and expression of a geranylgeranyl diphosphate synthase gene: insights into the synthesis of termite defence secretion. *Insect Mol Biol* **16**:1, 121–31 (2007).
63. Hojo, M.; Maekawa, K.; Saitoh, S.; Shigenobu, S.; Miura, T.; Hayashi, Y.; Tokuda, G.; Maekawa, H.: Exploration and characterization of genes involved in the synthesis of diterpene defence secretion in nasute termite soldiers. *Insect Mol Biol* **21**:6, 545–57 (2012).

64. Rudolf, J.D.; Chang, C.-Y.: Terpene synthases in disguise: enzymology, structure, and opportunities of non-canonical terpene synthases. *Nat Prod Rep* **37**:3, 425–63 (2020).
65. The National Institute of Standards and Technology: The NIST Chemistry WebBook: NIST Standard Reference Database 69. [on-line] Dostupné z URL: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/>> [cit. 29. 11. 2023].
66. Prestwich, G.D.: Chemical defense by termite soldiers. *J Chem Ecol* **5**:3, 459–80 (1979).
67. Ruan, J.-X.; Li, J.-X.; Fang, X.; Wang, L.-J.; Hu, W.-L.; Chen, X.-Y.; Yang, C.-Q.: Isolation and characterization of three new monoterpene synthases from *Artemisia annua*. *Front Plant Sci* **7**:638 (2016).
68. Frick, S.; Nagel, R.; Schmidt, A.; Bodemann, R.R.; Rahfeld, P.; Pauls, G.; Brandt, W.; Gershenzon, J.; Boland, W.; Burse, A.: Metal ions control product specificity of isoprenyl diphosphate synthases in the insect terpenoid pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:11, 4194–99 (2013).
69. Andersen, K.R.; Leksa, N.C.; Schwartz, T.U.: Optimized *E. coli* expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins* **81**:11, 1857–61 (2013).